

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Estudios del ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Jorge Ramírez Franco

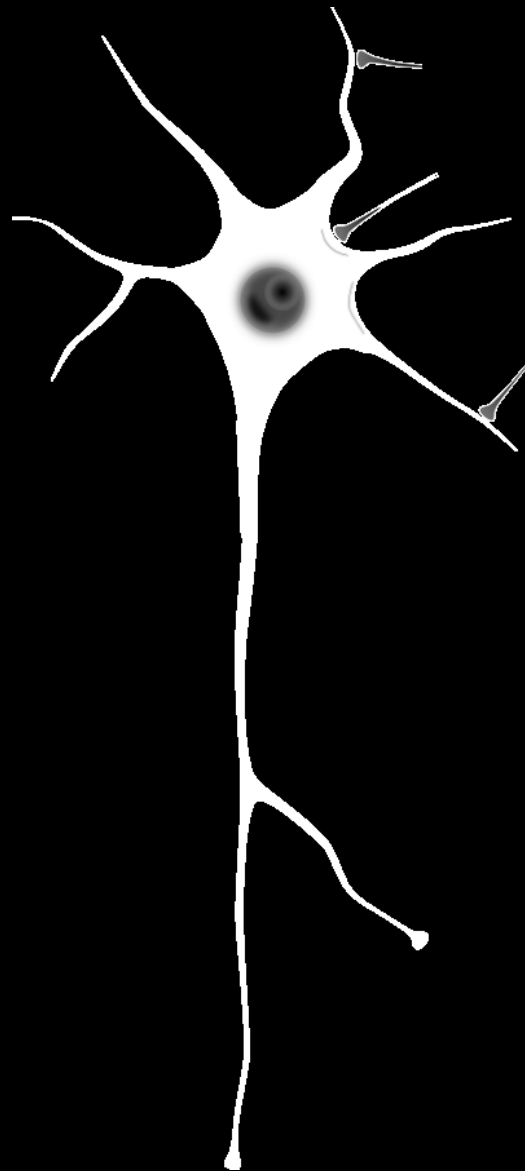
Directores

Magdalena Torres Molina
David Bartolomé Martín

Madrid, 2014



Estudios del ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



Estudios del ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata.

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

Estudios del ciclo vesicular en neuronas granulares de cerebelo de rata.

**Memoria presentada por: D. José Jorge Ramírez Franco
para optar al grado de Doctor.**

Directora de Tesis: Dra. Magdalena Torres

Co-director de Tesis: Dr. David Bartolomé

Vº Bº Directora:

Vº Bº Co-director:

Magdalena Torres

David Bartolomé

Agradecimientos

Alguien se preguntó una vez "¿Qué es la vida?". Si a mí me preguntasen, diría que es "Azar y necesidad". Por ello, quiero empezar agradeciéndole plenamente al azar este trabajo. Como biólogo, me debo a él.

En segundo lugar me gustaría agradecerle a Magdalena la oportunidad brindada al permitirme trabajar en su laboratorio y la confianza depositada en mí durante estos años al instarme a desarrollar la mayoría de ideas que se plantearon. Obviamente, haberme permitido desarrollar todas habría sido un error. Esta ha sido, sin duda, una de las "Oportunidades de mi vida" y espero haber correspondido en este tiempo. A Pepe, por mostrarme qué es la perseverancia por medio del ejemplo; por el siempre sabio y atento consejo que deriva de su cuasi clarividencia científica y, en definitiva, por ayudarnos a hacernos con el timón de un barco que de otro modo habría trastabillado indefectiblemente. A Deibi, por ser la definición viva de la palabra "amable". Por tu ayuda incondicional desde ambos lados del charco, por orientar, aconsejar, incitar y animar, de forma casi omnipresente, en la nebulosa de mi pensamiento. Por hacer el 80% del camino, que es el comienzo. Por tu concepto del Saber como un bien universal a compartir y por saber que es esto último, junto con la música, lo único que nos hace plenamente humanos. Por ser un amigo, un maestro, un confidente y tantas otras cosas que a las palabras sólo les está permitido quedarse a las puertas de definir. A Javi Díaz, por las charlas, las discusiones, las ideas, el apoyo incondicional y los atardeceres con Miguel Servet, pero sobre todo por ser esa persona en mi vida que prácticamente me obliga a seguir creyendo en los sueños; por ende gracias también a Candy, por haceros ustedes, el uno al otro, gran parte de lo que sois.

Gracias a José, porque, cómo alguien dijo, de la crítica surge el progreso, gracias de verdad, por compartir tu pensamiento con todo aquel que quisiera acercarse a él, te debo muchas; también a Patri, por tu ayuda desinteresada con nuestros gráficos de columnas. A Salvatore, por enseñarme una vez más que la voluntad es, casi, más

poderosa que el tiempo; por tantas vivencias y por el apoyo mutuo de aquellos primeros años. Eres ejemplar. A Mayka, por sorprenderme. Se echa de menos gente como tú en este mundo, gracias por enseñarme de orden y rigor científico a la vez que me has dado una lección en la vida acerca de como tener una mente abierta y plural. A Andrea C., por tantos momentos y pensamientos compartidos, por enseñarme a aprender con tu actitud desde el primer día que entraste en el laboratorio, por escucharme, por confiar y, por supuesto, por fumar. A Ana A., de la que aprendí a poner la mejor cara al peor tiempo. A Ricardo, por demostrarme que el tesón siempre acaba traducéndose en la derrota de la imposibilidad; en la ciencia, y en todo lo demás; y a Marta, por decir siempre las cosas tal y como son. A Felipe, ejemplo de que la integridad, la entereza y la excelencia científica no están reñidas con la mayor de las simpatías imaginables. A Bea, por aguantarme todo este tiempo. No debe de ser fácil, muchos días ni yo lo hago. Sigue adelante. A Alberto, por su madurez, por su mente crítica y por creer en las ideas. Gracias a vosotros dos por enseñarme a enseñar. A Roberto, por lo elegante de la simplicidad con que te haces un hueco en el corazón de las personas y por corroborarme aquella sospecha de que el que quiere, puede. Gracias también a Ángel por alguna que otra lección de autogestión del conocimiento y por hacer las cosas bien. No me olvido del bolígrafo. A toda la gente del ala sur del departamento: A Paula y Vero, compañeras de cursos de doctorado y de alguna que otra rutina burocrática o de intendencia, como se les llama ahora. A Laura, Aida y Mario, por aportarle un aire nuevo al laboratorio, por conferirle un poco de vuestra simpatía y naturalidad y por contagiarme una parte de esa jorjialidad que os caracteriza; también por los cafés de media tarde y por algún que otro atuendo. A Álvaro, porque, como creía el que más la amó, la ironía es la mejor forma de amar la existencia. A Nacho, por un buen puñado de valiosos consejos y por innumerables favores, y a Jesús, por tener siempre a mano alguna palabra agradable. No puedo olvidarme de Elena, por enseñarme las destrezas de jardinero de neuronas, ni de Carol, por los ánimos de los primeros meses en el lab. Querría agradecer también este trabajo a Agustín y a Marisa, del CNME, sin vosotros, la microscopía electrónica habría sido poco más que una intención.

Especial mención merecen todos los profesores de BBMMV, por ser la nuestra ardua empresa, en estos tiempos de agnosia, desprecio del mérito e indiferencia del saber; que nunca tengáis mayor pretensión de grandeza que la de enseñar a disfrutar por medio del conocimiento; que vuestro único fin, sea ponerle alas a las mentes, porque todo lo demás -incluso las estatuas- se dispersa en el olvido.

Agradezco este trabajo a todas las personas de las que aprendí algo de la vida o del estudio de esta en la facultad de Biológicas, en particular a Andrea R. y a Adán, amigos, e infatigables compañeros en el camino que elegimos hace tiempo ya. Por supuesto a Edu, por ser mi guía en alguna que otra circunstancia difícil y a Ene, por la calma y la alegría que transmites. También a Rubén, por las tardes de poesía ignea, por ser el Nunatak anfractuoso en la gélida masa uniforme. No puedo olvidarme de Carmen Rúa e Iñigo Aycoitia, por creer en la enseñanza y por enseñar a creer en algo.

A los arquitectos de mi vida: a Eli, por ser amiga y cómplice inseparable; por regalarme toda la magia del fondo de tus ojos y la constancia imperecedera de tu sonrisa alentadora; porque una vez más, sin ti, Ariadna, este laberinto habría sido muy difícil de salvar. Y, porque a día de hoy, todavía busco, "busco el término huido, la expresión inestable, que signifique, exacta, lo que eres". A mis mejores maestros, los de la calle; los que cuentan con la ventaja de la imprevisibilidad de sus lecciones; los que despiertan interés, porque dicen cosas interesantes. A J. Morgado, por lo vivido, lo contado, lo viajado y sobre todo, por ser un oasis de sensatez y cordura en medio de áridas vorágines; por ser un estandarte de razón y por hacerme comprender que nada, ni siquiera la vida, va del todo en serio. A Jabo, por enseñarme pragmatismo y filosofía existencial y por transmitirme esa particular visión de la libertad como una guerra diaria y constante contra uno mismo. Ana C. y Diego, escultores de un futuro que es presente, de ese ahora que se sublima en el mañana, gracias por seguir ahí. A la gente de Villafamés, especialmente a David R. y Robert, por ser el refugio donde la mente puede cobijarse de las largas avenidas y desafiar sin miedo al tiempo. A Claudia, Inés y En, por demostrarme, con su actitud, que la felicidad es cuestión de voluntad. Al marinero de su destino, Adrián, por el

respeto, el cariño y por su sabiduría musical. A Juanda y Repe, por estar cerca cuando todo empezó. A toda la gente del Celta de Vino, por arroparme y por enseñarme que la edad es un estado de la mente. A B. Rungal, por estar ahí en momentos difíciles y por compartir los momentos alegres. A la poesía y la música, en general.

Y, como dicen los ingleses, "last but not least", a mis Padres. En primer lugar por la vida, sin ella creo que todo lo demás es imposible. También por hacer de mi casi todo lo que soy y por enseñarme a hacer el resto. Por transmitirme esa ávida pasión por el conocimiento y los libros, a la vez que me dejasteis saborear la libertad en cada momento, por vuestro calor, vuestros cuidados, vuestro cariño y por mostrarme la fuerza que reside en el deber y la rectitud, Por la mente crítica y la ironía, también por saber soñar. Gracias por enseñarme los placeres de la lectura y de la ciencia y por ayudarme a entender que el tener es secundario en este mundo. Después de al azar, es de justicia agradecerlos esto a vosotros.

En definitiva, a todos los que me ayudasteis a construir mi vida estando cerca, a los protagonistas de mis memorias y mis vivencias y también a los actores secundarios, pues todo; absolutamente todo, cuenta. Ni la más angustiosa de las soledades, ni siquiera el caprichoso Jano, podría con vuestro recuerdo.

Porque somos lo que percibimos, lo que recordamos, lo que nos proponemos y, accidentalmente, lo que conseguimos, ¡gracias!

Summary

Synaptic transmission in the mammalian nervous system is mainly based on chemical synapses. These synapses contain a cluster of small vesicles that are filled up with neurotransmitter molecules, referred to as synaptic vesicles (SVs) (Sudhof, 2012). Upon the arrival of an action potential to the presynaptic compartment, calcium influx through voltage gated calcium channels (VGCC) promotes the fusion of these SVs with the plasma membrane, leading to the release of the neurotransmitter into the synaptic cleft (Sudhof, 2004). Once in the extracellular space neurotransmitter molecules bind to postsynaptic receptors (Attwell y Gibb, 2005), propagating, in this way, the nerve impulse through neuronal networks. The released neurotransmitter can also activate presynaptic receptors which, in turn, modulates neurotransmitter release.

Axonal sites of neurotransmitter release, also known as Active Zones (AZs), contain a high density of VGCC surrounded by a complex network of proteins that interact among them, positioning SV's in the vicinity of calcium channels; these proteins make up the so called cytomatrix at the active zone (CAZ) (Gundelfinger y Fejtova, 2012; Sudhof, 2012). All together, these features justify the high sensitivity and the exceptionally tight regulation of SV fusion. However, during trains of repetitive stimulation neurons have to reuse their vesicular content to sustain the fidelity of synaptic transmission. The concept of the synaptic vesicle cycle emerges from this scenario, in which local vesicular recycling through endocytosis and re-acidification can be understood as the limiting step of the synaptic efficiency (Betz y Angleson, 1998; Sudhof, 2004). SV cycle comprises four sequential steps. At a first stage, SV's establish a physical contact and **dock** to the presynaptic plasma membrane; here, the vesicles will be **primed**, acquiring full exocytic competence. Later on, calcium-triggered **exocytosis** gives rise to the fusion of the vesicles with the presynaptic plasma membrane. The lipidic moiety corresponding to the SV's will be retrieved through compensatory **endocytosis**, and then, after refilling, the vesicles will be able to participate in a subsequent round of exocytosis.

By making use of a dual strategy in live cell imaging, electron microscopy techniques, and pharmacological experiments, we have characterized two different steps of the synaptic vesicular cycle in cultured cerebellar granule neurons. VgluT-pHluorin and FM1-43 experiments combined with correlative post-hoc immunocytochemistry, allowed us to study large populated samples of individual nerve terminals.

Regarding endocytic mechanisms we have encountered that synaptic efficiency, in terms of SV reuse, is limited during strong neuronal stimulation due to the co-existence of effective and ineffective endocytic pathways. The ineffective endocytic pathways, which resemble some of the features of bulk endocytosis (Clayton y Cousin, 2009), are started up as a consequence of the massive exocytosis of SVs that takes place during high neuronal activity, and involve the accumulation of non-releasable endosomes at the presynaptic level. Moreover, we found that these forms of non-vesicular endocytosis showed a developmentally regulated switch towards efficient forms of SV retrieval at later maturational stages. Interestingly, while dynamin GTPase activity was not necessary for the scission of these endosomes, its interaction with the plasma membrane appeared

to be crucial for this process. As expected, efficient forms of recycling were virtually abolished by dynamin inhibition. Calcineurin activity seemed to be participating in vesicular recycling to a higher extent than in endosomal recycling. As recycling efficiency scales up with the immunoreactivity of key synaptic proteins at the individual synaptic level, we propose that synaptic efficiency, in terms of SV reuse, is a hallmark of synaptic maturation (Bartolome-Martin *et al.*, 2012).

On the other hand, we have partially dissected the exocytic defects underlying the well established paradigm of cannabinoid-mediated presynaptic depression (Kreitzer y Regehr, 2001). We found that a prolonged activation of type 1 cannabinoid receptor (CB1R), strongly inhibited synaptic exocytosis by means of a drop in cAMP levels. When analyzing at the single synaptic level some of the puncta analyzed were completely reluctant to synaptic exocytosis after CB1R activation, which led us to classify them as silent synapses. This effect was not associated to a reduction in calcium entry through VGCC, and could be prevented by incubation with forskolin. This cAMP drop seemed to operate by EPAC-dependent rather than by PKA-dependent mechanisms. At the ultrastructural level, CB1R activation elicited a withdrawal of the SV closer to the plasma membrane at presynaptic active zones. We also demonstrate that the susceptibility to CB1R-mediated synaptic silencing was largely determined by the RIM1 α content at individual nerve terminals. All together, we propose that CB1R activation exerts an heterogeneous inhibitory effect over different synapses, giving rise to a lack of exocytosis in a subset of presynaptic terminals. This fact could be related to cannabinoid mediated LTD.

Bibliography

- Attwell, D. y Gibb, A. (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 841-849.
- Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. y Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434.
- Betz, W.J. y Angleson, J.K. (1998) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Physiol*, **60**, 347-363.
- Clayton, E.L. y Cousin, M.A. (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, **111**, 901-914.
- Gundelfinger, E.D. y Fejtova, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 423-430.
- Kreitzer, A.C. y Regehr, W.G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, **29**, 717-727.
- Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.
- Sudhof, T.C. (2012) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.

2-AG: 2 Araquidonil Glicerol.

AC: Adenilato ciclasa.

AEA: Anandamida.

AMPA: Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (se refiere al receptor ionotrópico activado por este compuesto).

AP-1/AP-2/AP-3/AP-180: *Adaptor Protein 1/2/3/180* o proteína adaptadora (de clatrina) 1/2/3/180.

AZ: Zona Activa.

BAR (dominio): Bin-Amfifisina-Rv.

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor* o Factor neurotrófico derivado del cerebro.

BPB: *Bromophenol Blue* o Azul de bromofenol.

CaMKII: Calcio-Calmodulina Quinasa II.

CaMKIV: Calcio-Calmodulina Quinasa IV.

CaMKK: Calcio-Calmodulina Quinasa Quinasa.

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico.

CAPS: *Calcium dependent Activator Protein for Secretion* o Proteína Calcio dependiente activadora de la secreción.

CAST: *Cytomatrix at the Active zone STructural protein* o proteína estructural de la citomatrix de la zona activa.

CB1R: Receptor de Cannabinoides de tipo 1.

CB2R: Receptor de Cannabinoides de tipo 2.

Cdk5: Quinasa dependiente de ciclina 5.

CGC: Células Granulares de Cerebelo.

CREB: *Cyclic AMP Response Element Binding factor* o Factor de unión a los elementos de respuesta a cAMP.

DAG: Diacil Glicerol

DEP (dominio): Dishevelled-Egl10-Plecstrina.

DGL α : DiacilGlicerol Lipasa α .

DIV: Días *In vitro*.

DSE: Supresión de la excitación inducida por despolarización.

DSI: Supresión de la inhibición inducida por despolarización.

EBSS: Earle's Balanced Salt Solution Solución de sales estabilizada de Earle.

Abreviaturas

EGL: *External granule layer* o capa granular externa.

E_n: día Embrionario n.

EPAC: *Exchange Protein directly Activated by cAMP* o proteína intercambiadora activada por cAMP.

FAAH: *Fatty Acid Amido Hidrolase* o Amido hidrolasa de ácidos grasos.

FITC: Fluoresceína Isotiocianato.

FM1-43: *Fei Mao 1-43*.

GABA B: Receptor GABA B.

GABA: Ácido Gamma Amino Butírico.

GAPdh: Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa.

GDP: Guanosin difosfato

GEF (dominio): *Guanine Nucleotide Exchange Factor* o factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

GFP: Green Fluorescent Protein o proteína fluorescente verde.

GluA3: Subunidad A3 del receptor AMPA.

GPCR: *G-Protein Coupled Receptors* o receptores acoplados a proteínas G.

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3.

GTP: Guanosin Trifosfato.

HBM: *HEPES buffer medium* o medio tamponado con HEPES.

HU-210: *Hebrew University 210*, agonista cannabinoide.

IGL: *Inner granule layer* o capa granular interna.

LTD: *Long Term Depression* o Depresión a largo plazo.

LTP: *Long Term Potentiation* o Potenciación a largo plazo.

MAC: *Mitochondria Anchoring Complex* o complejo de anclaje mitocondrial.

MGL: MonoacilGlicerol Lipasa.

Munc: *Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype* u homólogo mamífero de *fenotipo desordinado*.

NMDA: N-Metil-D-Aspartato (se refiere al receptor ionotrópico activado por este compuesto).

NO: Óxido nítrico.

NT: Neurotransmisor.

Nurr1: *Nuclear Receptor Related Protein 1* o Proteína similar a Receptor Nuclear.

PA: Potencial de acción.

PBS: *Phosphate Buffer Saline* o tampón fosfato salino.

PC: *Purkinje Cell* o célula de Purkinje.

PDBu: 4- β -forbol-12, 13-dibutirato.

PF: *Parallel Fiber* o fibra paralela.

PH (dominio): *Pleckstrin Homology* o dominio homólogo a plecstrina.

PIP(4,5)₂: Fosfatidil Inositol 4,5 , Bisfosfato.

PKA: Proteína Quinasa A.

PKB: Proteína quinasa B.

PLC: Fosfolipasa C.

PLD: Fosfolipasa D.

P_n: día Postnatal n.

PPAR γ : *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* o receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

PSD: *Post-synaptic Density* o Densidad Postsináptica.

PTx: Toxina pertúsica.

Rab: *Ras in the Brain* o Ras en el cerebro.

REM (dominio): *Ras Exchange Motif* o motivo de intercambio de Ras.

RIM: *Rab Interacting Molecule* o molécula de interacción con Rab.

RIM-BP: *RIM Binding Protein* o Proteína de unión a RIM.

ROI: *Region of Interest* o Region de interés.

RRP: *Readily Releasable Pool* o conjunto de vesículas preparadas para su liberación .

SDS: Dodecil Sulfato sódico.

SM: *Sec1/Munc18 like proteins* o proteínas similares a Sec1/Munc18.

SNAP: *Soluble NSF Attachment Protein* o proteína unida a NSF soluble.

SNARE: *SNAP REceptors* o receptores de SNAP.

SNC: Sistema Nervioso Central.

STD: *Short Term Depression* o Depresión a corto plazo.

SV2: *Synaptic Vesicle protein 2* o proteína de vesícula sináptica 2.

TRPV1: *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* o Receptor de vaniloides de potenciales transitorios de tipo 1.

Abreviaturas

TTx: Tetrodotoxina.

UBC: *Unipolar Brush Cells* o células unipolares en cepillo.

VAMP: *Vesicle associated Membrane Protein* o Proteína asociada a las membranas vesiculares.

V-ATPasa: *Vacuolar-ATPase* o ATPasa vacuolar.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* o Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VGluT1: *Vesicular Glutamate Transporter 1* o transportador vesicular de glutamato de tipo 1.

Índice

I-Introducción.....	3
1-Regionalización, estructura y función del cerebelo.....	3
1.1-Citoarquitectura del cerebelo.....	6
1.2-Circuitería y neuroquímica.....	10
1.3-Histogénesis cerebelar.....	13
2-La sinapsis glutamatérgica.....	17
2.1-La zona activa.....	22
2.1.1-La arquitectura de la zona activa.....	25
2.2-El ciclo vesicular sináptico.....	29
2.2.1-Exocitosis.....	29
2.2.2-Preparación de las vesículas.....	31
2.2.3-Fusión calcio dependiente de las vesículas.....	34
2.2.4-Endocitosis.....	36
2.2.4.1-Endocitosis mediada por clatrina.....	38
2.2.4.2-Endocitosis en masa.....	44

2.3-Los "pools" de vesículas sinápticas.....	47
3-El sistema endocannabinoide.....	49
3.1-Síntesis de endocannabinoides.....	50
3.2-Receptores cannabinoides.....	51
3.3-Degradación.....	53
3.4-Plasticidad mediada por cannabinoides.....	54
3.4.1-Plasticidad a corto plazo: DSI y DSE.....	54
3.4.2-Plasticidad a largo plazo: LTD.....	56
4-Sinapsis silentes.....	62
 II-Objetivos.....	 67
II.1-Endocytosis.....	69
II.2-Exocytosis.....	70

III-Materiales y métodos	73
III.1-Resumen gráfico I	75
III.2-Resumen gráfico II	76
1-Materiales	77
1.1 Material biológico	77
1.2 Equipos	78
1.2.1-Electroporación y cultivos	78
1.2.2- Adquisición de imagen, microscopios y cámaras	78
1.2.3- Detección de proteínas	79
1.2.4- Acumulación de cAMP	79
1.3 Reactivos, anticuerpos y fármacos	79
1.3.1-Material de cultivos	79
1.3.2- Acumulación de cAMP	80
1.3.3- Microscopía electrónica	80
1.3.4- Inmunodetección	81

1.3.4.1- Anticuerpos primarios.....	81
1.3.4.2- Anticuerpos secundarios, líquido de montaje, sueros, cubreobjetos y portaobjetos.....	82
1.3.5- Extracción de proteínas, electroforesis y transferencia.....	82
1.3.6- Experimentos de imagen en célula viva.....	83
1.3.6.1- Sales.....	83
1.3.6.2- Fármacos.....	83
1.3.6.3- Sondas.....	85
2-Métodos.....	85
2.1-Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata y electroporación.....	85
2.1.1-Protocolo.....	86
2.1.1.1- Preparación de cubreobjetos.....	86
2.1.1.2- Realización del cultivo.....	87
2.1.1.3- Electroporación.....	89
2.2-Obtención de sinaptosomas.....	93
2.3-Extracción de proteínas e inmunodetección.....	94

2.3.1-Extracción de proteínas totales.....	94
2.3.2-Electroforesis y transferencia a membrana.....	95
2.4-Inmunocitoquímica.....	98
2.5-Imagen en célula viva.....	100
2.5.1-FM1-43.....	100
2.5.1.1-Tampones.....	103
2.5.1.2-Protocolo.....	103
2.5.1.3- Protocolos gráficos.....	105
2.5.2-VGluT1-pHluorina.....	110
2.5.2.1-Tampones.....	113
2.5.2.2-Protocolos.....	113
2.5.2.3-Protocolos gráficos.....	115
2.5.3-FURA2-AM.....	117
2.5.3.1-Tampones.....	118
2.5.3.2-Protocolos.....	118
2.6-Microscopía electrónica.....	120

2.6.1-Tampones.....	120
2.6.2-Protocolos.....	120
2.6.2.1-Microscopía en sinaptosomas.....	120
2.6.2.2-Microscopía en células.....	122
2.7- Niveles de cAMP.....	127
2.8- Inmunocitoquímica <i>post-hoc</i>	128
2.8.1-Protocolo.....	128

3-Procesamientos informáticos

3.1-Inmunodetección en membranas.....	131
3.2-FM1-43.....	131
3.3-VGluT1-pHluorina.....	136
3.4-Fura2-AM.....	138
3.5-Inmunocitoquímica <i>post-hoc</i>	138
3.6-Inmunocitoquímica.....	139
3.7-Microscopía electrónica.....	139
3.7-Estadística y ajustes.....	140

IV-Resultados	143
1-Diferencias en la eficacia e reciclamiento subyacen a la heterogeneidad de respuestas en neuronas granulares de cerebelo en cultivo	145
2- La magnitud del evento excitótico determina la eficacia de reciclamiento	150
3-Bajas concentraciones de FM1-43 marcan las vías de reciclamiento ineficaz	152
4-El reciclamiento ineficaz está asociado a formas lentas de endocitosis	154
5-Papel de la dinamina en las distintas formas de reciclamiento vesicular	155
6-Contribución diferencial de la calcineurina a las distintas formas de reciclamiento	160
7-El fenómeno de <i>Kiss & Run</i> no está implicado en las formas ineficaces de reciclamiento	162

8-Análisis ultraestructural del ciclo vesicular sináptico: las formas ineficaces de reciclamiento están asociadas a endocitosis en masa.....	165
9-La eficacia de reciclamiento como marcador de la maduración neuronal.....	170
10-Marcadores presinápticos asociados con la eficacia de reciclamiento.....	177
11- Receptores presinápticos y eficacia de reciclamiento.....	180
12-Regulación de la eficacia de liberación vesicular por el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1R) e inducción de silenciamiento sináptico.....	184
13-Independencia de calcio del fenómeno de silenciamiento sináptico.....	191
14-Efectos ultraestructurales asociados a la activación del receptor CB1.....	200
15-La activación del receptor CB1 induce una reducción del pool de reciclamiento.....	202

16-La inducción de silenciamiento es atribuible a una reducción en los niveles de cAMP.....	206
17-La activación de la vía del cAMP previene, de forma PKA-independiente y EPAC-dependiente, la inducción de silenciamiento mediada por CB1R.....	207
18-La activación de la proteína EPAC es capaz de revertir el fenómeno de silenciamiento sináptico.....	213
19-Marcadores presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento mediado por CB1R.....	217
V-Discusión.....	225
1-Diferencias en la eficacia e reciclamiento y heterogeneidad en respuestas sinápticas.....	227
2-La magnitud de la exocitosis determina la eficacia de reciclamiento.....	230
3-Concentraciones de FM1-43 y eficacia de reciclamiento.....	231

4-Las formas de endocitosis poco eficaces persisten tras la estimulación. Coexistencia de rutas de reciclamiento.....	234
5-Papel de la dinamina en las distintas formas de reciclamiento.....	236
6-Papel de la calcineurina en ambas formas de endocitosis.....	239
7-Posible implicación de los fenómenos de "Kiss&Run" en el reciclamiento ineficaz.....	242
8-Análisis ultraestructural de terminales sinápticos.....	243
9- La eficacia de reciclamiento como marcador de maduración.....	246
10- Marcadores presinápticos y eficacia de reciclamiento.....	249
11- Receptores presinápticos y maduración neuronal.....	250

12- Regulación de la liberación vesicular por el receptor CB1. Silenciamiento sináptico.....	252
13- Calcio independencia del fenómeno de silenciamiento.....	254
14- Análisis ultraestructural del fenómeno de silenciamiento sináptico.....	257
15- Redistribución de los <i>pools</i> de vesículas sinápticas mediada por la activación de CB1.....	258
16- Farmacología del fenómeno de silenciamiento.....	258
17- Reversibilidad del proceso de silenciamiento. Implicaciones en la plasticidad.....	260
18- Determinantes presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento.....	265

VI-Conclusiones.....	269
1.1 Endocitosis y reciclamiento.....	271
1.2 Exocitosis.....	272
VII-Bibliografía.....	275
VIII-Anexos.....	i
Anexo I.....	iii
Anexo II.....	vi
Anexo III.....	viii
Anexo IV.....	x
Anexo V.....	xii
Anexo VI.....	xiv

I- Introducción

"Man at last knows he is alone in the unfeeling immensity of the universe, out of which he has emerged only by chance. His destiny is nowhere spelled out, nor is his duty. The kingdom above or the darkness below; it is for him to choose."

J.L. Monod

I-Introducción

La palabra *encéfalo* proviene del griego *ἐγκέφαλον* (*én/en* que significa dentro y *κέφαλον/kefalos* que significa cabeza) y hace referencia al principal órgano del sistema nervioso central (SNC), que orquesta tanto las funciones conscientes como la mayoría de funciones vegetativas. El *encéfalo* de mamífero se encuentra subdividido en tres regiones: el *prosencefalo* o cerebro anterior, que comprende el telencéfalo (corteza cerebral) y el diencefalo (tálamo, subtálamo hipotálamo y epitálamo); el *mesencefalo* o cerebro medio, que constituye el nexo anatómico entre el cerebro anterior y el posterior y alberga la sustancia nigra, el núcleo rojo y los tubérculos cuadrigéminos; y por último el *rombencefalo* o cerebro posterior, que comprende el mielencéfalo (bulbo raquídeo y pares craneales VIII, IX, X, XI y XII) y el metencéfalo (puente, cerebelo y pares craneales V, VI, VII y VIII) (Kandel *et al.*, 2000; Jacobson y Marcus, 2008).

1-Regionalización, estructura y función del cerebelo

El cerebelo es una estructura que deriva de la porción antero-dorsal del rombencéfalo y se sitúa en el techo del cuarto ventrículo (Hashimoto y Hibi, 2012). Se encuentra físicamente conectado al tronco cerebral por tres pares de haces de fibras, que reciben el nombre de pedúnculos cerebelosos: El pedúnculo cerebeloso inferior, por el que cursan principalmente aferencias ascendentes homolaterales de información propioceptiva (tracto espino-cerebeloso e información desde el núcleo inferior de la oliva), el pedúnculo cerebeloso medio por el que ingresan principalmente las aferencias cortico-pontino-cerebelares (información motora proveniente de corteza) y el pedúnculo cerebeloso superior, principal vía de salida de las eferencias cerebelosas ascendentes hacia los núcleos Ventral Anterior y Ventral Lateral del tálamo (los que constituyen el

denominado tálamo motor) y hacia el núcleo rojo así como de las eferencias descendentes hacia el núcleo paramedial reticular, con importantes funciones en el control postural y de orientación espacial (Jacobson y Marcus, 2008). El cerebelo funciona a modo de centro comparador y refinador del movimiento, lo que queda evidenciado si atendemos a las conexiones que establece con las distintas áreas del sistema nervioso. Por un lado, recibe información descendente de la orden emitida por la corteza motora y por otro, recibe información ascendente propioceptiva. Estas informaciones permiten la comparación entre el movimiento intencional (orden motora emitida por corteza) y el movimiento actual (el movimiento que realmente se está llevando a cabo), del que informan las aferencias propioceptivas. Una vez integradas y comparadas estas informaciones, el cerebelo lleva a cabo la modulación fina del movimiento mediante la inervación del tálamo motor y del sistema reticular descendente (Ito, 2006; Hashimoto y Hibi, 2012). Por tanto, se puede considerar al cerebelo como un centro evaluador y regulador del movimiento fino, que actúa comparando la orden motora emitida con la que realmente se ha llevado a cabo (Kandel *et al.*, 2000; Hashimoto y Hibi, 2012). Las principales aferencias y eferencias del cerebelo quedan recogidas en la tabla 1. En los últimos años se ha sugerido que el cerebelo, aparte de su papel canónico, pudiera estar modulando funciones cognitivas y emocionales por medio de los denominados modelos de control interno (Ito, 2008). Estas especulaciones se basan en el hecho de que la filogenia de las zonas laterales de los hemisferios cerebelares es más reciente que la del resto del cerebelo y paralela a la aparición filogenética de corteza cerebral asociativa. Además, estas zonas laterales adquieren una mayor prominencia en primates y humanos (Ramón y Cajal, 1899; Leiner *et al.*, 1986; 1993; Kandel *et al.*, 2000; Ito, 2008).

Aferencias del cerebelo:

A. Pedúnculo cerebelar inferior

1. Ipsilaterales:

Del tracto espinocerebelar dorsal y del tracto cuneocerebelar.
Reticulocerebelar (de formación reticular lateral y núcleo paramediano)

2. Contralaterales: Olivocerebelar

B. Pedúnculo cerebelar medio

Aferencias cortico-pontino-cerebelares, decusan desde el hemisferio cerebral contralateral.

C. Pedúnculo cerebelar superior

Aferencias contralaterales espinocerebelares, principalmente hacia el paleocerebelo. La función principal de este pedúnculo es eferente.

Eferencias del cerebelo:

A. Pedúnculo cerebelar inferior

1. Vía núcleo fastigial, al núcleo vestibular lateral y áreas reticulares del tronco encefálico
2. Vías fastigio-reticulares y fastigio-vestibulares

B. Pedúnculo cerebelar medio

Eferencias a núcleos pontinos.

C. Pedúnculo cerebelar superior

1. Desde núcleos dentado e interpuesto, contralateral hacia tálamo VA y tálamo VL. También hacia el núcleo rojo
2. Información descendente hacia el núcleo reticular paramediano

Tabla 1. Principales aferencias y eferencias que cursan por los pedúnculos cerebelares.

Macroscópicamente, en el cerebelo, pueden distinguirse tres regiones dispuestas latero-medialmente: la vermis o región media; la paravermis o región paramedial y los hemisferios cerebelares. El cerebelo está compuesto por una corteza de estructura trilaminar, que engloba a una capa interna de sustancia blanca (constituida por las aferencias y eferencias cerebelares) y tres núcleos cerebelares profundos: el núcleo

fastigial; el núcleo interpuesto (constituido a su vez por dos núcleos: el globoso y el emboliforme) y el núcleo dentado (Kandel *et al.*, 2000; Jacobson y Marcus, 2008). La estructura trilaminar de la corteza cerebelosa tiene su origen en teleósteos superiores y está altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva (Hashimoto y Hibi, 2012).

El cerebelo posee una estructura altamente ordenada y modular que en mamíferos se dispone en 10 lóbulos (I-X), aunque los patrones de foliación de cada uno de ellos pueden variar en la escala filogenética (Sillitoe y Joyner, 2007). Cada uno de estos lóbulos o folias conserva la citoarquitectura trilaminar característica a lo largo de todo el eje latero-medial (Ramón y Cajal, 1899). Esta homogeneidad histológica lleva a pensar que distintas regiones del cerebelo llevan a cabo procesos computacionales de características similares, operados probablemente sobre distintas entradas de información topográficamente organizadas.

1.1-Citoarquitectura del cerebelo

Desde una perspectiva citológica el cerebelo se compone de neuronas excitatorias, neuronas inhibitorias y células gliales. Entre las neuronas excitatorias glutamatérgicas encontramos principalmente las neuronas granulares, las células unipolares en cepillo o UBCs (del inglés *Unipolar Brush Cells*) y neuronas excitatorias de proyección de los núcleos cerebelares profundos. Entre las neuronas inhibitorias GABAérgicas encontramos numerosos tipos celulares entre las que cabe destacar las neuronas de Purkinje, por ser estas las principales neuronas eferentes de la corteza cerebelar, aunque han de citarse también los numerosos tipos de interneuronas que están presentes en la corteza cerebelar, cuya función es llevar a cabo procesos de modulación intrínsecos. Entre estas encontramos las células de Golgi, las células de Lugaro, células en

candelabro, células en cesta y células estrelladas (Altman y Bayer, 1997). Existen también interneuronas pequeñas en los núcleos cerebelares profundos (Sillitoe y Joyner, 2007). En cuanto a las células no neuronales, caben destacar las células de la glía de Bergmann, un tipo de astrocito de cerebelo cuya disposición recuerda la de la glía radial en corteza y posee importantes funciones de soporte y señalización durante la migración de las células granulares (Xu *et al.*, 2013). Además, existen astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales. Todas estas células se disponen en una estructura trilaminar que comprende, desde la zona más superficial a la más interna, las siguientes capas: 1) La capa plexiforme o molecular, 2) la capa de las células de Purkinje y 3) la capa de las células granulares.

La *capa plexiforme* está constituida principalmente por los axones de las células granulares o fibras paralelas y las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje, formando un intrincado plexo de conexiones que da origen a su nombre. Es en este estrato donde se establece la sinapsis entre los terminales glutamatérgicos de la fibra paralela y las dendritas de la célula de Purkinje (sinapsis PF-PC), cuyo elemento presináptico es el objeto del estudio que se detallará a lo largo de este trabajo. El aspecto tenue y granuloso de las antiguas tinciones con hematoxilina es el motivo por el que también se conoce como capa molecular (Ramón y Cajal, 1899). Entre el plexo de fibras se pueden distinguir además interneuronas en cesta y estrelladas, prolongaciones distales de la glía de Bergmann y aquellos terminales de las fibras trepadoras que establecen contactos axo-dendríticos con las neuronas de Purkinje.

La *capa de las células de Purkinje* está formada por los somas de dichas células y por los terminales axónicos excitatorios de las fibras trepadoras, cuyo soma se encuentra en el núcleo olivar inferior, mientras que sus terminales se disponen rodeando los somas de las neuronas de Purkinje y estableciendo sinapsis de tipo axo-somático. La naturaleza

neuroquímica de estos terminales ha sido objeto de controversia durante años debido a una mala interpretación de resultados electrofisiológicos (Toggenburger *et al.*, 1983), si bien es cierto que a día de hoy está ampliamente aceptada su naturaleza glutamatérgica (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000). Interpuestas entre los somas de las células de Purkinje se encuentran los somas de las interneuronas en candelabro.

La *capa de células granulares* contiene principalmente los somas de las neuronas granulares, aunque también se encuentran en este estrato los somas de las UBCs, las interneuronas de Golgi y las de Lugaro. Las interneuronas de Golgi son activadas por las fibras paralelas de la capa plexiforme y establecen sinapsis sobre las dendritas de las mismas neuronas granulares, constituyendo un elemento regulador endógeno de la actividad de las neuronas granulares modulado, a su vez, por la actividad de estas. Encontramos en este estrato los terminales glutamatérgicos de las fibras musgosas que establecen contactos con las dendritas de las neuronas granulares, constituyendo la principal entrada de información al cerebelo. A la unidad funcional constituida por los terminales presinápticos de las neuronas de Golgi y de las fibras musgosas, y por el elemento postsináptico aportado por las neuronas granulares se le denomina glomérulo cerebeloso (Ramón y Cajal, 1899; Palkovits *et al.*, 1971; Ito, 1984).

Por debajo de las tres capas de corteza cerebelosa se encuentra el cableado de fibras que conecta el cerebelo con distintas regiones del encéfalo. Encontramos fibras aferentes y eferentes, que cursarán por los pedúnculos cerebelosos, así como fibras intrínsecas, cuya función es la de conectar distintas áreas del cerebelo tanto homolateral como contralateralmente, lo que permite tareas de sincronización y comparación. También se encuentran aquí los núcleos cerebelares profundos, estación de relevo obligatoria para las eferencias cerebelosas, a excepción de aquellas que inervan el núcleo vestibular.

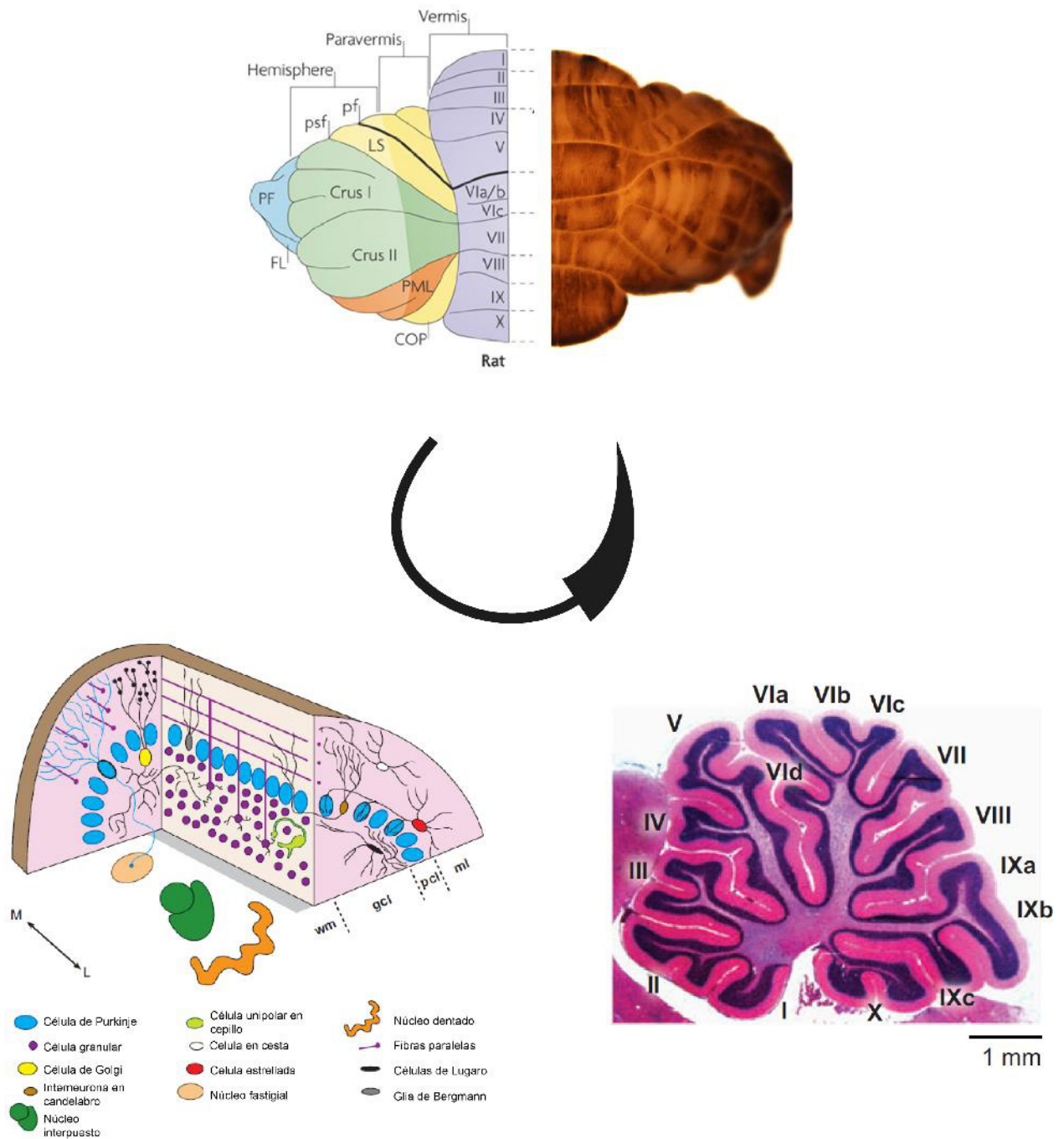


Figura 1- Estructura macroscópica e histológica del cerebelo. Se muestra la regionalización macroscópica del cerebelo, así como cortes transversales en los que se muestra la citoarquitectura de la corteza cerebelar y la organización esquemática de una laminilla. GCL: Capa de células granulares; PCL: Capa de células de Purkinje; ML: Capa plexiforme o molecular (Adaptado de (Sillitoe y Joyner, 2007; Apps y Hawkes, 2009))

1.2-Circuitería y neuroquímica

El circuito neuroquímico del cerebelo fue descrito alrededor del año 1960 por John Eccles y Masao Ito, el primero de ellos recibió en 1963 el premio Nobel de fisiología y medicina por sus investigaciones. Este circuito es relativamente simple, si se atiende exclusivamente a su función moduladora del movimiento. Sólo hay dos tipos de axones que ingresan en el cerebelo, los de las fibras trepadoras y los de las fibras musgosas. Las fibras trepadoras se originan exclusivamente en el núcleo olivar inferior, mientras que las fibras musgosas recogen el resto de entradas de información al cerebelo. Ambas son de naturaleza glutamatérgica (excitatoria), excitando aquellas neuronas con las que sinaptan. Una vez que entran en el cerebelo, tanto las fibras musgosas como las trepadoras emiten colaterales que sinaptan sobre las neuronas de los núcleos cerebelares profundos.

A medida que ascienden en la corteza cerebelosa, las fibras musgosas se ramifican exhaustivamente. Cada una de las fibras musgosas establece sinapsis sobre una población de dendritas de las neuronas granulares lo que causa su activación, a continuación el axón de la célula granular se dirige hacia la superficie externa de la corteza cerebelosa (capa plexiforme) donde se divide formando una "T", y es entonces cuando atraviesa, en paralelo con el eje de la folia cerebelosa, los árboles dendríticos formados por las neuronas de Purkinje, con los que establecen sinapsis "*en passant*" (así denominadas debido a que no son sinapsis terminales, sino que se establecen a lo largo de todo el recorrido del axón). Cada una de las neuronas de Purkinje establece sinapsis con varios cientos de miles de fibras paralelas, cada uno de estos fascículos de fibras que sinapta sobre una neurona de Purkinje se conoce con el nombre de haz (del inglés *beam*). Además, las fibras paralelas establecen contactos excitatorios con las

interneuronas de Golgi, las estrelladas y las interneuronas en cesta. La activación de las neuronas de Purkinje puede ser sumatoria, en términos sinápticos, si atendemos a la innervación que recibe desde las neuronas granulares.

Los axones de las células de Purkinje son los únicos que abandonan la corteza del cerebelo, haciendo sinapsis sobre los núcleos cerebelares profundos y sobre algunas neuronas vestibulares. Las neuronas de Purkinje son neuronas GABAérgicas que ejercen una potente inhibición sobre las distintas neuronas con que sinaptan. Por tanto, la entrada de información excitatoria en el cerebelo activa las neuronas de los núcleos cerebelares profundos, así como a las neuronas granulares. Estas a su vez excitarán las neuronas de Purkinje, cuya función es entonces inhibir las neuronas de los núcleos cerebelares profundos. Este es un paso crítico del circuito cerebeloso, en el que se lleva a cabo un refinamiento de la información eferente sobre las neuronas de los núcleos cerebelosos (Hashimoto y Hibi, 2012). Podemos entender este proceso como un refinamiento de la actividad a la baja, similar al que lleva a cabo un escultor, en el que va eliminando porciones de la pieza inicial para dar forma, en este caso, a un patrón de actividad neuronal. Las fibras trepadoras establecen sinapsis excitatorias directas sobre las células de Purkinje. La relación entre las fibras trepadoras y las neuronas de Purkinje es 1:1, lo que significa que existe una íntima relación entre las neuronas del núcleo olivar inferior y las células de Purkinje. Se cree que el núcleo olivar inferior funciona como un detector de errores, cuando se lleva a cabo una acción errática, se activa el núcleo olivar inferior y posteriormente las neuronas de Purkinje correspondientes, a través de las fibras trepadoras. Esto conlleva la inhibición de los núcleos cerebelares profundos lo que acarrea el término del componente indeseado (error) de la acción. El refinamiento de los patrones motores tiene lugar mediante procesos de plasticidad sináptica, mayoritariamente en la sinapsis que se establece entre la fibra paralela y la

célula de Purkinje. En esta sinapsis se han descrito, tanto procesos de depresión como de potenciación que podrían guardar relación con una memoria relacionada con los patrones motores. Los fenómenos de LTD y STD (del inglés *Long Term Depression* y *Short Term Depression* respectivamente) presináptica que acontecen en las fibras paralelas han sido fruto de numerosas investigaciones y parecen guardar una estrecha relación con este tipo de aprendizaje (Ito, 1989; 2002; 2006; Porrill y Dean, 2008; Rothman *et al.*, 2009)

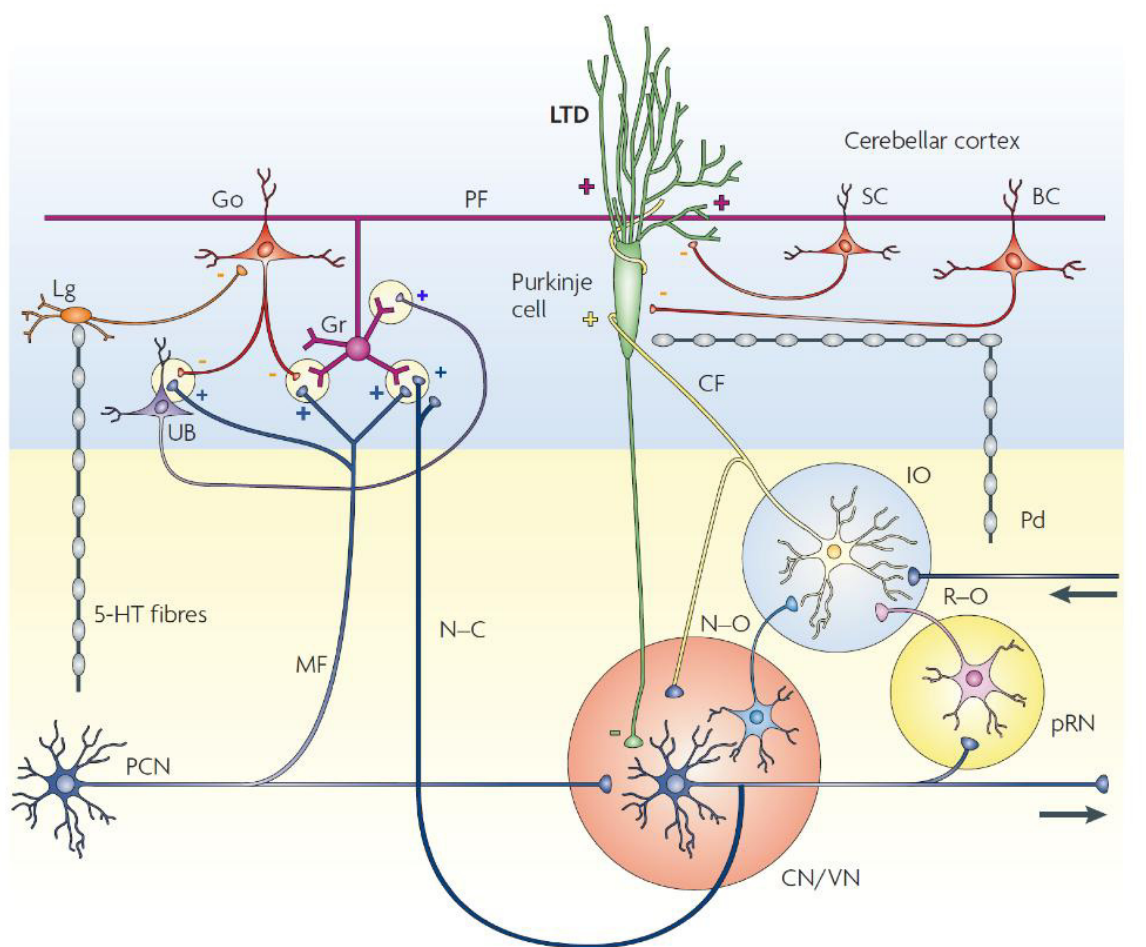


Figura 2- Circuito cerebelar básico. Esquema del circuito básico del cerebelo, se identifican con "+" las sinapsis excitatorias y con "-" las inhibitorias. Lg: Cel. de Lugaro; Go: Cel. de Golgi; UB: Cel. Unipolares en cepillo. Gr: Cel. Granulares; PF: Fibras paralelas; SC: Cel. Estrelladas; BC: Cel. en cesta; MF: Fibras musgosas; CF: Fibras trepadoras. PCN: Núcleos precerebelares; CN/VN Nucleos cerebelares/vestibulares; IO: Oliva inferior; pRN: Núcleo Rojo (parvocelular) N-C: Vias intrínsecas Núcleo-corticales; N-O: Núcleo-Olivares; R-O: Proyecciones Rubro-Olivares. Adaptado de (Ito, 2008)

1.3-Histogénesis cerebelar

Los precursores de las células de Purkinje se originan en el neuroepitelio del cuarto ventrículo, llevando a cabo una migración radial desde la pared del ventrículo hacia la corteza cerebelosa (Altman y Bayer, 1978); la mayoría de las interneuronas GABAérgicas del cerebelo también sigue esta ruta migratoria, lo que las conduce a su localización final (Zhang y Goldman, 1996). Las neuronas de Purkinje forman entonces la placa de células de Purkinje que es, en los primeros estadios, una estructura multilaminar, formándose la monocapa final en estadios postnatales tempranos (Altman y Bayer, 1978; Hibi y Shimizu, 2012; Xu *et al.*, 2013). Los precursores de las células granulares se dispersan tangencialmente en dirección rostral sobre la superficie dorsal del cerebelo a partir del labio rómbico superior, este movimiento morfogénico origina la llamada capa granular externa (EGL del inglés *External Granule Layer*) que queda situada por encima de la capa de células de Purkinje (Altman y McCrady, 1972; Altman y Bayer, 1997; Chung *et al.*, 2010). Esta capa granular externa se comporta como una zona germinal secundaria que prolifera a partir del día E17 (Xu *et al.*, 2013) siguiendo un gradiente antero-dorsal y dilatando su ventana proliferativa hasta el estadio postnatal de P10. El pico de proliferación se produce alrededor de P7, momento escogido para realizar los cultivos de células granulares de cerebelo de rata, por conservar estas dos características esenciales para la realización de un cultivo celular: pluripotencia y cierta capacidad proliferativa. Parece ser que el mitógeno *Shh* (del inglés *Sonic HedgeHog*) secretado por las células de Purkinje es la señal que mantiene la actividad proliferativa de los precursores en la EGL (Spassky *et al.*, 2008; Chedotal, 2010). En el cerebelo postnatal temprano (hasta P3), las células presentes en la EGL migran tangencialmente (Komuro *et al.*, 2001). A partir de P5 y hasta P15 (con un pico comprendido entre P7 y P12) las células experimentan un proceso de migración radial, atravesando la capa de

células de Purkinje y usando para su guía las prolongaciones de la glía de Bergmann (Xu *et al.*, 2013). El par de moléculas Sema6A (Semaforina 6A) y su receptor PlexinaA2 controlan el inicio de este periodo de migración radial (Komuro *et al.*, 2001; Chedotal, 2010) ya que controlan los movimientos del núcleo (Chedotal y Renaud, 2008) y la dinámica de la polimerización/despolimerización de actina (Renaud *et al.*, 2008). Numerosas moléculas difusibles como el BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Zhou *et al.*, 2007) o el VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Ruiz de Almodovar *et al.*, 2010) han sido implicadas en la continuidad de este proceso de migración. Estas moléculas pueden ser secretadas por las células de la glía de Bergmann y señalizar de forma paracrina en las células granulares, pues se adhieren a sus prolongaciones, como ocurre con el VEGF o bien pueden ser sintetizadas y secretadas por las propias células granulares, señalizando de forma autocrina (Zhou *et al.*, 2007). También han sido implicadas en el proceso migratorio varias moléculas de adhesión celular expresadas por la glía de Bergmann como la astrotactina, la profilina o la β 1-Integrina (Xu *et al.*, 2013). Durante este periodo, la supervivencia de las células granulares es dependiente de actividad, lo que se traduce en una entrada de calcio presumiblemente mediada por el receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato) (Jurado *et al.*, 2003), si bien es cierto que los receptores AMPA permeables a calcio parecen jugar también un papel importante en la supervivencia dependiente de calcio que este tipo celular exhibe en periodos tempranos del desarrollo (Condorelli *et al.*, 1993; Incontro *et al.*, 2011). La entrada de calcio conlleva finalmente la activación de una cascada pro-supervivencia en la que está crucialmente implicada el factor Nurr1 (Barneda-Zahonero *et al.*, 2012). El BDNF y el calcio parecen actuar de forma sinérgica en la promoción de la supervivencia de la célula granular. El gradiente de BDNF generado por las células de la capa granular interna induce la síntesis y secreción de BDNF desde las propias

neuronas granulares, este bucle de retroalimentación positiva potencia el gradiente de BDNF, lo que ha sido puesto de manifiesto en animales carentes de la proteína CAPS2 (del inglés *Calcium-dependent Activator Protein for Secretion*). Esta proteína se encuentra asociada a las vesículas de secreción de BDNF y Neurotrofina3, en los ratones carentes de esta proteína, la migración de las células granulares sufre un severo retraso por los defectos de señalización autocrina y de amplificación del gradiente (Sadakata *et al.*, 2007). Además el calcio juega un importante papel en la regulación de la transcripción del BDNF. Se ha descrito que la transcripción del BDNF es dependiente del factor CREB (del inglés *cyclic AMP Response Element-Binding protein*), este factor se activa por fosforilación dependiente de la Calcio Calmodulina Quinasa IV (CaMKIV) que a su vez es fosforilada por la Calcio Calmodulina Quinasa Quinasa (CaMKK), la pérdida de cualquiera de estas dos quinasas conlleva una disminución de los niveles de BDNF así como un retraso en la migración de las células granulares (Kokubo *et al.*, 2009). Además, el calcio, actuando a través de la ya mencionada cascada de fosforilaciones sobre el factor CREB, parece regular también la transcripción de Nurr1; este factor de transcripción también se une al promotor del gen del BDNF induciendo su transcripción, lo que también contribuye a la amplificación del gradiente (Barneda-Zahonero *et al.*, 2012). La expresión de distintos tipos de canales iónicos (tanto receptores como canales operados por voltaje) está finamente regulada a lo largo de la migración, lo que de nuevo pone de manifiesto la importancia de la señalización por calcio en la supervivencia temprana y en la migración de las células granulares inmaduras (Komuro y Rakic, 1992). De hecho se ha propuesto que el proceso migratorio podría estar orquestado por los cambios en el proteoma de membrana y las fluctuaciones de calcio intracelular que estos desencadenarían (Komuro y Rakic, 1998). El glutamato necesario para la activación de los receptores AMPA y NMDA durante el

proceso de migración parece provenir de la incipiente invasión aferente que estas células reciben durante este periodo, motivo por el cual el cultivo de células granulares de cerebelo ha de realizarse en condiciones despolarizantes con el objeto de emular el estado de excitación de las membranas durante este periodo (Gallo *et al.*, 1987). De forma paralela a la oleada migratoria, la célula granular extiende su axón hacia la capa granular externa y este va adquiriendo su particular forma de "T", lo que le hace establecer un vínculo constante con su lugar de origen (Espinosa y Luo, 2008; Xu *et al.*, 2013). En el estadio P15, prácticamente la totalidad de las células que formaban la EGL han ingresado en la capa granular interna o IGL (del inglés *Inner Granule Layer*) y a partir de P21 la capa granular externa ha desaparecido completamente, habiéndose originado ya la estructura trilaminar característica del cerebelo adulto.

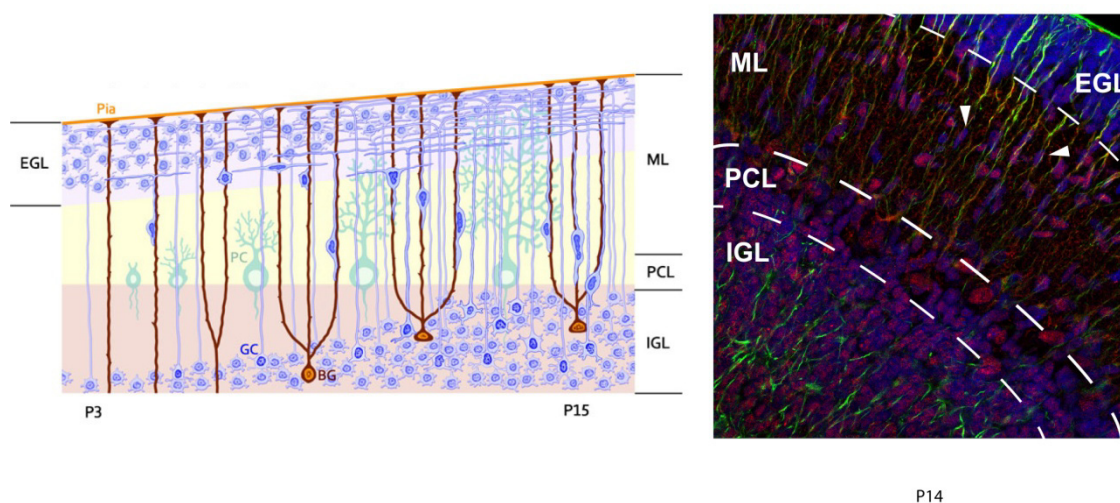


Figura 3- Migración de las células granulares desde la capa granular externa a la capa granular interna. Esquema que ejemplifica el patrón cronológico de migración de la capa granular externa a la interna y micrografía correspondiente a una laminilla cerebelosa en P14. Obsérvense las células migrando radialmente junto a las prolongaciones de la glía de Bergmann (puntas de flecha). Adaptado de (Incontro *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013)

2-La sinapsis glutamatérgica

La transmisión de información entre dos células puede tener lugar de diversos modos y es imprescindible para el mantenimiento de la correcta homeostasis de organismos pluricelulares. Posiblemente, el mayor grado de especialización de este fenómeno lo encontremos en la comunicación entre células del sistema nervioso, en concreto en la transmisión de información neurona-neurona o sinapsis (Kotaleski y Blackwell, 2010). La transmisión de información entre dos neuronas siempre está codificada en términos químicos o eléctricos, dando lugar a cambios en los gradientes de los iones que mantienen el equilibrio químico y eléctrico de una célula, lo que a su vez generará, bien perturbaciones en el potencial de membrana de dicha célula, o bien en las concentraciones de diferentes mensajeros extra e intracelulares y por tanto dará lugar a oscilaciones en diferentes actividades enzimáticas y/o fluctuaciones en la expresión génica. Actualmente se conocen dos formas mayoritarias de transmisión sináptica, las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas. En las sinapsis eléctrica, la transmisión de información se da de forma directa, ya que las neuronas adyacentes se encuentran en contacto por medio de uniones intercelulares que comunican sus citoplasmas (concebidas como sinapsis “rudimentarias” evolutivamente, típicas de organismos inferiores). En las sinapsis químicas, la transmisión es indirecta, e implica la liberación de un mensajero químico (neurotransmisor) por el terminal axónico de la neurona presináptica y la recepción de dicho mensajero por complejos proteicos generalmente ubicados en la dendrita de la neurona postsináptica (este tipo de sinapsis es considerada más “avanzada” en términos evolutivos). Si bien es cierto que determinados núcleos y generadores de ritmos del encéfalo de mamíferos se rigen por sinapsis eléctricas (Connors y Long, 2004), la gran mayoría de la transmisión sináptica en el encéfalo de mamíferos es explicable por sinapsis de tipo químico.

En las sinapsis químicas existe una separación espacial entre la neurona presináptica y la postsináptica, espacio que recibe el nombre de brecha o hendidura sináptica donde se secreta el neurotransmisor por parte de la neurona presináptica. La distancia de esta brecha sináptica es de unos 30nm (Cowan *et al.*, 2001), y es esta separación la que confiere a este tipo de sinapsis dos de sus más importantes propiedades, la discontinuidad espacio-temporal en la propagación del impulso nervioso y la posibilidad de amplificar (o silenciar) una determinada señal presináptica en función de características intrínsecas de la neurona postsináptica (número y tipo de receptores así como el estado de activación de los mismos), aunque las propiedades que caracterizan a una sinapsis en concreto dependen tanto de su elemento presináptico como del postsináptico (Koester y Johnston, 2005). Además, en función de las sinapsis aferentes que reciba una determinada neurona postsináptica, este tipo de sinapsis permite una elevada capacidad de integración al poder ser activados receptores de distintos tipos de neurotransmisores o bien distintos receptores que respondan al mismo neurotransmisor, sobre una misma membrana postsináptica. En términos generales, el inicio de la transmisión sináptica se podría definir cronológicamente de la siguiente manera: la llegada de un potencial de acción (PA) al terminal presináptico genera, debido a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, una elevación transitoria de la concentración de calcio en la zona activa que desencadena la fusión calcio-dependiente de las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor y consecuentemente el vertido de neurotransmisor a la hendidura sináptica. La activación de los receptores presentes en la neurona postsináptica daría continuidad al impulso nervioso, que se propagaría de esta manera por la red neuronal (Sudhof, 2004; Sudhof y Rizo, 2011). Todos los eventos comprendidos entre la invasión del terminal presináptico por el potencial de acción y el desencadenamiento de la respuesta que concluye con la génesis

de un nuevo potencial de acción en la neurona postsináptica suceden en un tiempo inferior a 2ms (Sudhof, 2012a).

El L-Glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el sistema nervioso central de mamíferos, su acción como neurotransmisor es conocida desde 1960 (Curtis *et al.*, 1960). Aproximadamente un 40% del glutamato sintetizado en el terminal presináptico se debe a la actividad de la enzima glutaminasa, localizada en las mitocondrias de los terminales presinápticos, que lleva a cabo la hidrólisis del grupo amino de la cadena lateral de la glutamina. La glutamina necesaria para esta reacción es transferida a las neuronas desde las prolongaciones astrocitarias que rodean la brecha sináptica (Siegel, 2006). El Glutamato restante parece provenir directamente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por medio de la transaminación del α -cetoglutarato. El glutamato es introducido en la vesícula sináptica por medio de sus transportadores específicos, VGluT1 (Takamori *et al.*, 2000), VGluT2 (Aihara *et al.*, 2000; Takamori *et al.*, 2001) y VGluT3 (Freneau *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2002). Clásicamente se ha considerado que estos son antiportadores que incorporan glutamato en la vesícula sináptica en contra de gradiente gracias a la disipación de un gradiente electroquímico de protones previamente generado por las V-ATPasas (del inglés *Vacuolar ATPases*) (Tabb *et al.*, 1992; Wolosker *et al.*, 1996), sin embargo investigaciones recientes parecen poner de manifiesto que el potencial de membrana de la vesícula sináptica es responsable en gran medida del transporte de glutamato (Bellocchio *et al.*, 2000; Juge *et al.*, 2006; Juge *et al.*, 2010; Omote *et al.*, 2011). Una vez que las vesículas han incorporado el glutamato en su interior (a una concentración aproximada de 150mM (Burger *et al.*, 1989; Takamori *et al.*, 2006)), se disponen en la zona activa en la proximidad de los canales de calcio dispuestas a ser liberadas ante la llegada del potencial de acción. Las zonas activas son puntos del axón especializados en la

liberación de neurotransmisores, en los que gracias a una compleja red de proteínas se posibilita un acoplamiento muy rápido entre el calcio y la maquinaria exocitótica que permite la elevada fidelidad de la transmisión sináptica (Sudhof, 2004; Gundelfinger y Fejtova, 2012). Cuando el glutamato es liberado a la hendidura sináptica activa a distintos receptores específicos presentes en la membrana postsináptica, además de receptores presentes en la membrana presináptica o la astrocitaria, estos receptores pueden ser de tipo ionotrópico constituidos por los subtipos AMPA (Honore *et al.*, 1982; Hollmann y Heinemann, 1994), NMDA (Jahr, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994) y Kainato (Hollmann y Heinemann, 1994; Lerma, 1997; Rodriguez-Moreno y Lerma, 1998) o metabotrópicos (Nicoletti *et al.*, 1986; Masu *et al.*, 1991; Nicoletti *et al.*, 2007).

El conjunto de acontecimientos moleculares que tiene lugar en el terminal presináptico desde que una vesícula cargada con neurotransmisor se fusiona con la membrana de la zona activa, hasta que vuelve a estar disponible para un nuevo evento exocitótico recibe el nombre de reciclamiento vesicular (Sudhof, 2004; Shupliakov y Brodin, 2010). Podemos dividir el reciclamiento vesicular en tres etapas, la primera es la fase de *endocitosis* consistente en la recuperación de la superficie de membrana correspondiente a las vesículas sinápticas que se han fusionado durante la estimulación (esta comprende a su vez una serie de pasos que se detallarán más adelante); la siguiente etapa consiste en la *re-acidificación* del lumen de la vesícula sináptica, hecho indispensable para poder llevar a cabo la última etapa del reciclamiento, la *reincorporación de nuevas moléculas de neurotransmisor* en la vesícula sináptica. La continuidad temporal entre los eventos exocitóticos y el reciclamiento vesicular a dado pie a la aparición del concepto del ciclo de las vesículas sinápticas (Heuser y Reese, 1973; Valtorta *et al.*, 1989; Zimmermann *et al.*, 1989; Betz y Bewick, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993; Betz y Angleson, 1998)

considerada como la más estrechamente regulada de todas las vías de tráfico intracelular (Sudhof, 1995). Este término engloba todos los eventos relacionados con la exocitosis y con el reciclamiento vesicular, siendo un importante objeto de estudio en la fisiología sináptica actual. El concepto de ciclo vesicular incorpora el reciclamiento como un factor limitante en la eficacia sináptica, hecho que se puso de manifiesto en los mutantes *Shibire* de *Drosophila* (Koenig y Ikeda, 1989; Chen *et al.*, 1991). Cuando un terminal sináptico recibe un tren de potenciales de acción a una frecuencia elevada, el paso que limita de forma crucial la disponibilidad de vesículas, y por tanto la fidelidad de la transmisión sináptica, es el reciclamiento vesicular (von Gersdorff, 2001; Sudhof, 2004; Dittman y Ryan, 2009; Shupliakov y Brodin, 2010). A continuación se detallarán los distintos pasos del ciclo vesicular tratando de relacionarlos con el conocimiento actual de la ultraestructura de las zonas activas.

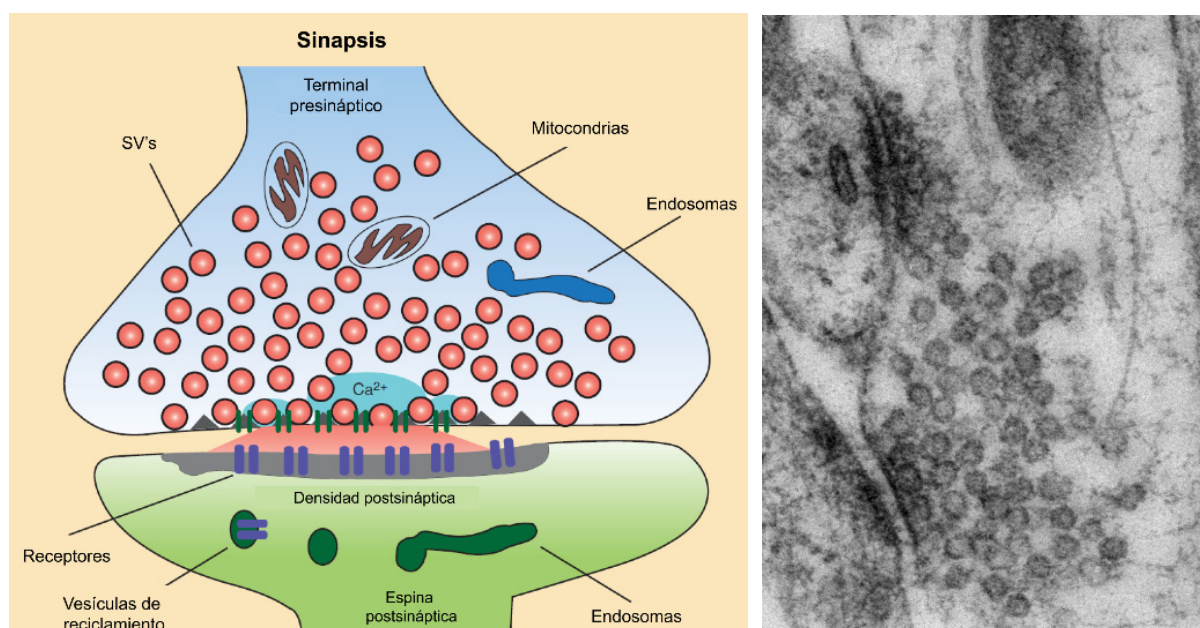


Figura 4- Esquema general de una sinapsis glutamatérgica. Se ilustra tanto el elemento presináptico como el postsináptico. Obsérvese la íntima relación existente entre la maquinaria de secreción y la onda de calcio, así como la aposición del elemento pre y postsináptico. Micrografía electrónica de una sinapsis glutamatérgica en células granulares de cerebelo en cultivo. Adaptado de (Sudhof, 2012a), la micrografía electrónica es cortesía del Dr. Bartolomé-Martín.

2.1-La zona activa

El termino Zona Activa (AZ) fue introducido por primera vez en 1967 (Jabonero, 1967; Dreyer *et al.*, 1973) y hace referencia a aquellos puntos del axón de la célula presináptica encargados de la fusión dependiente de calcio de las vesículas que contienen el neurotransmisor. En las sinapsis del SNC de mamíferos las zonas activas son estructuras discoidales en íntima aposición con la estructura postsináptica con un diámetro comprendido entre 0.2 y 0.5 μm (Schikorski y Stevens, 1997; Xu-Friedman *et al.*, 2001; Sudhof, 2012b) y cuya función principal es orquestar el acoplamiento rápido entre la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisor (Eggermann *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013). Los elementos principales de las zonas activas son las vesículas sinápticas y la membrana presináptica con la que las vesículas experimentan el proceso de fusión. Una característica importante de estos sitios de liberación es la elevada densidad de canales de calcio operados por voltaje en la membrana presináptica (Robitaille *et al.*, 1990) que posibilita la creación de microdominios de calcio y justifica la extraordinaria regulación de la fusión calcio-dependiente de las vesículas sinápticas (Chad y Eckert, 1984; Llinas *et al.*, 1995; Augustine *et al.*, 2003; Schneggenburger y Neher, 2005; Bucurenciu *et al.*, 2008; Scimemi y Diamond, 2012; Schneggenburger *et al.*, 2012). Las vesículas sinápticas se encuentran en la cercanía de estos microdominios de calcio, lo que permite una elevada sensibilidad al calcio de las vesículas más próximas a los canales (Neher, 1998; Schneggenburger *et al.*, 2012) y esta disposición es posible gracias a una compleja red de interacciones proteína-proteína que tiene lugar entre los canales de calcio y la maquinaria exocitótica (Seagar *et al.*, 1999; Spafford y Zamponi, 2003; Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011). Las zonas adyacentes a las zonas activas, se denominan zonas perisinápticas. La endocitosis compensatoria de las vesículas tiene lugar en estas zonas (Wan *et al.*, 2000; Wenk y De Camilli, 2004;

Newton *et al.*, 2006; Evergren *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008), además en las zonas perisinápticas se encuentran las moléculas de adhesión celular que mantienen la íntima aposición del aparato pre y post-sináptico, como el par neuroligina (postsinápticas)-neurexina (presinápticas), las SynCAM (del inglés *SYN*aptic *C*ell *A*dhesion *M*olecules) o las cadherinas (Yamagata *et al.*, 1995; Uchida *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999; Biederer, 2006). Estas zonas perisinápticas también albergan algunos de los receptores presinápticos metabotrópicos y sus complejos de señalización intracelular, como es el caso de algunos subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Kinoshita *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997; Fukaya *et al.*, 2008) o del principal receptor presináptico de endocannabinoides (CB1R) (Nyiri *et al.*, 2005; Kawamura *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Puente *et al.*, 2010) ambos con importantes funciones en el control de la liberación de neurotransmisor. Existe un elemento adicional presente en la mayoría de las sinapsis del SNC de mamíferos y al que únicamente se le ha atribuido una importancia parcial: la mitocondria (Palay, 1956; Xu-Friedman *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que las zonas activas requieren un alto aporte de energía y que estas pueden distar, en el caso de las CGC, varias micras del soma neuronal, se hace necesaria la presencia de mitocondrias sinápticas que puedan satisfacer la demanda energética de los sitios de liberación de NT (Tang y Zucker, 1997; Ivannikov *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2010). Además, las mitocondrias parecen jugar un papel en el tamponamiento de los niveles de calcio presinápticos, pudiendo contribuir de este modo al control de la eficacia sináptica (Billups y Forsythe, 2002). Las mitocondrias aparecen ancladas a las zonas activas por un entramado filamentoso denominado complejo de anclaje a la mitocondria o MAC (del inglés *Mitochondria Anchoring Complex*). El tamaño de esta estructura es de aproximadamente 200 nm y su composición proteica es desconocida (Tolbert y Morest, 1982; Perkins *et al.*, 2010).

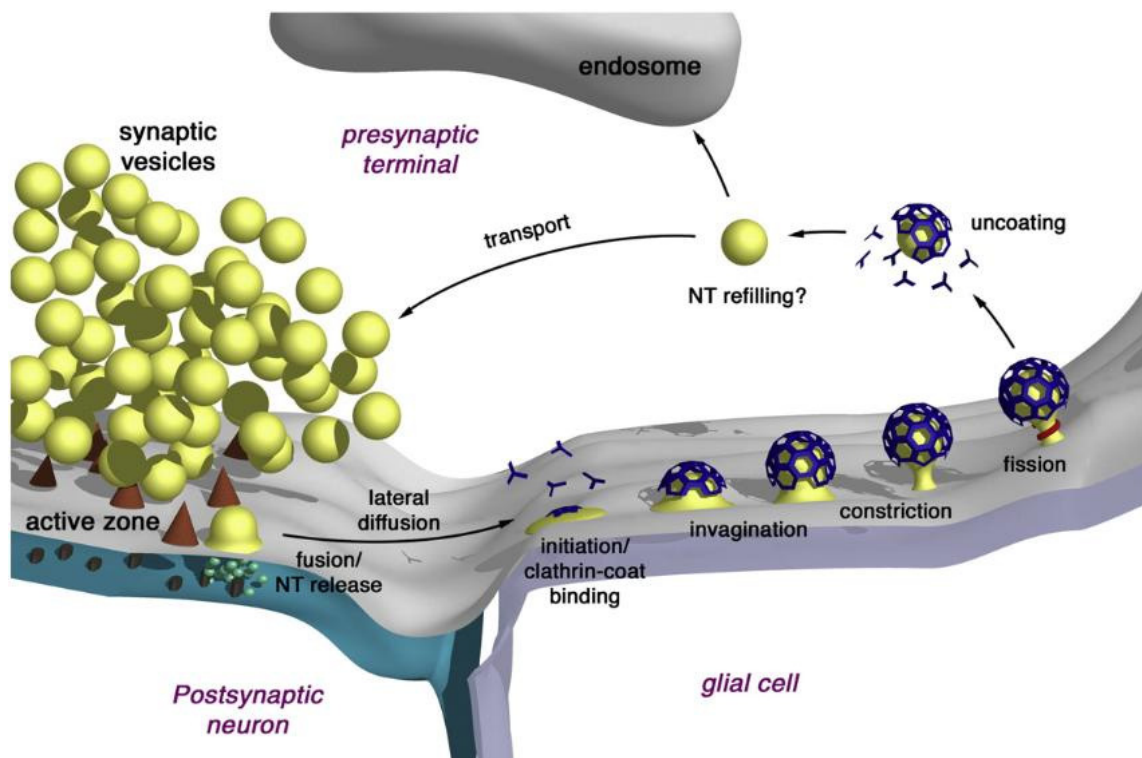


Figura 5- Esquema de la zona activa y una zona perisináptica. Obsérvese la disposición de las vesículas alrededor de los sitios de liberación de la zona activa. Las vesículas se liberan en la zona activa y se trasladan, por difusión lateral, a las zonas adyacentes. El reciclamiento vesicular tiene lugar preferentemente en las zonas perisinápticas. Adaptado de (Shupliakov y Brodin, 2010)

2.1.1-Arquitectura de la zona activa

Se puede definir una zona activa como una compleja cascada de interacciones proteína-proteína (Sudhof, 1995). El intrincado plexo de interacciones moleculares que acontece en las zonas activas tiene lugar fundamentalmente entre siete proteínas: RIM (del inglés *Rab3 Interacting Molecule*) (Wang *et al.*, 1997), Munc13-1 (del inglés *Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype 13*) (Brose *et al.*, 1995), RIM-BPs (del inglés *RIM-BindingProteins*) (Wang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011), ELKS/CAST (del inglés *Cytomatrix at the Active zone STructural protein*) (Ko *et al.*, 2003; Deguchi-Tawarada *et al.*, 2004) y α -liprinas (Serra-Pages *et al.*, 1995; Zhen y Jin, 1999), que conformarían el núcleo de la zona activa (Wang *et al.*, 2009; Sudhof, 2012b). Estas proteínas, junto con las proteínas Piccolo (Cases-Langhoff *et al.*, 1996) y Bassoon (tom Dieck *et al.*, 1998) parecen extenderse hacia el interior del terminal presináptico debido a su gran tamaño (Limbach *et al.*, 2011; Gundelfinger y Fejtova, 2012) y constituyen la citomatrix de la zona activa. Excepto α -liprina y ELKS/CAST, algo más simples en su estructura, las demás proteínas mencionadas son proteínas modulares con diferentes dominios, lo que permite una elevada combinatoria de interacciones mediante las que se posibilitan las funciones de la zona activa (anclaje y preparación de las vesículas sinápticas, acoplamiento de la maquinaria exocitótica a la entrada de calcio gracias al reclutamiento de canales, interacción con moléculas de adhesión celular y propiedades plásticas del aparato exocitótico). Al microscopio electrónico, las zonas activas muestran una apariencia de rejillas hexagonales de agregados electrodensos entre las que se encuentran intercaladas las vesículas sinápticas, estos agregados reciben el nombre de "proyecciones densas" y se encuentran enfrentados a la densidad postsináptica en las sinapsis asimétricas (Pfenninger *et al.*, 1972; Limbach *et al.*, 2011). Estudios recientes de ultraestructura combinados con inmunodetección, han revelado que las proteínas

Munc13 y RIM se encuentran distribuidas entre las proyecciones electrodensas y muy cerca de la membrana plasmática, guardando una íntima relación espacial con las vesículas sinápticas. En cuanto a las proteínas Piccolo y Bassoon, estas parecen contener su extremo C-terminal en las zonas medias y distales de las proyecciones electrodensas, mientras que su extremo N-terminal se extiende hacia el interior del citoplasma (Siksou *et al.*, 2009; Limbach *et al.*, 2011). Esta organización topológica es acorde a la descrita con técnicas ultra-resolutivas de microscopía óptica (Dani *et al.*, 2010). Los extremos N-terminal tanto de Munc13 como de RIM distan tan solo 20 nm de los extremos C-terminal de Piccolo y Bassoon lo que aporta una explicación a la interacción física descrita entre estas moléculas (Wang *et al.*, 2009; Limbach *et al.*, 2011). ELKS/CAST se sitúa en el centro de las proyecciones electrodensas (Siksou *et al.*, 2007) y esta localización es coherente con las interacciones que esta molécula establece con Piccolo, Bassoon, Munc13 y RIM (Ohtsuka *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2002; Jose *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Hida y Ohtsuka, 2010). Como se comentó previamente, una elevada densidad de canales de calcio en el terminal presináptico es indispensable para una eficiente liberación de neurotransmisor una vez el PA invade el terminal presináptico. El confinamiento de canales de calcio voltaje-dependientes en las zonas activas (Limbach *et al.*, 2011) es posible gracias a dos interacciones descritas: la de las RIM-BPs con canales de calcio dependientes de voltaje, y con su subunidad accesoria (β) (Hibino *et al.*, 2002; Kiyonaka *et al.*, 2007) que da lugar a un complejo que comprende a RIM, RIM-BPs y canales de calcio; y la interacción directa de RIM, por medio de su dominio PDZ, con el dominio C-terminal tanto de canales de tipo P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) como de canales de tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) (Wong y Stanley, 2010; Kaeser *et al.*, 2011). El complejo heterotrimérico formado entre Munc13, RIM y la GTPasa pequeña de la membrana de las vesículas sinápticas, Rab3 (Fischer von Mollard *et al.*, 1990),

actúa como nexo entre las vesículas y las partes distales de las proyecciones electrodensas de la zona activa (Dulubova *et al.*, 2005), lo que parece guardar relación con el papel de RIM en un primer anclaje de las vesículas sinápticas a la zona activa (Gracheva *et al.*, 2008; Kaeser *et al.*, 2011). Existen controversias acerca de los estudios ultraestructurales de las zonas activas realizados en distintas condiciones, ya que los fijadores químicos como los aldehídos, parecen promover la agregación de los complejos proteicos generando artefactos. Este hecho se puso de manifiesto al usar técnicas de congelación a elevadas presiones, que permiten preservar la ultraestructura de la muestra sin el uso de fijadores químico (Landis *et al.*, 1988), en este caso no se observan las proyecciones electrodensas y sólo hay evidencias de una maraña de conectores entre las distintas vesículas y entre estas y la membrana plasmática (Landis *et al.*, 1988; Siksou *et al.*, 2007; Fernandez-Busnadiego *et al.*, 2010). Empero, cabe destacar que las posiciones relativas de los epítomos de las distintas proteínas constituyentes de la zona activa no parecen modificarse al usar diferentes técnicas de fijación (Siksou *et al.*, 2007; Siksou *et al.*, 2009; Limbach *et al.*, 2011) y que los conectores siguen siendo visibles con técnicas de fijación convencionales, aunque en menor proporción (Perkins *et al.*, 2010). Esto hace que a día de hoy las técnicas de microscopía electrónica con fijadores químicos sigan estando ampliamente aceptadas para los estudios ultraestructurales de la zona activa, ya que el hecho de que una estructura no sea visible no necesariamente implica que esa estructura no exista (Sudhof, 2012b).

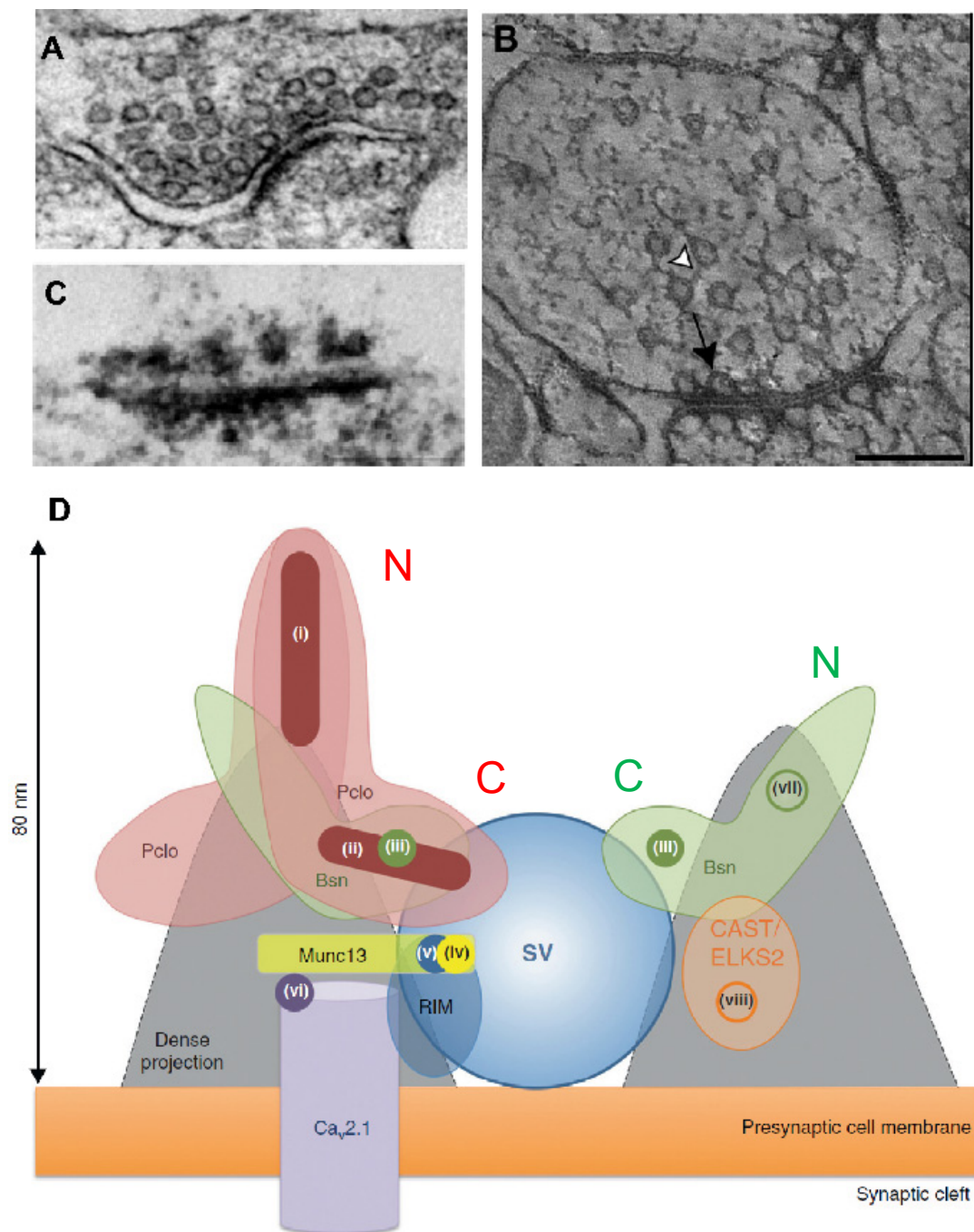


Figura 5- Micrografías electrónicas de zonas activas obtenidas mediante técnicas de fijación química (A) o mediante congelación a altas presiones (B). En (C) se observan las proyecciones electrodensas en íntima aposición con la densidad post-sináptica (PSD). La disposición relativa de las proteínas que forman la zona activa se muestra en (D). Adaptado de (Siksou *et al.*, 2007; Kaeser *et al.*, 2011; Gundelfinger y Fejtova, 2012)

2.2-El ciclo vesicular sináptico

El conjunto de pasos de tráfico vesicular intracelular que comprenden la adquisición de competencia exocitótica plena por parte de una vesícula sináptica, su fusión con la membrana plasmática y su posterior fisión de esta por endocitosis, así como el proceso de reacidificación del lumen vesicular que precede a la reincorporación de nuevas moléculas de glutamato en su interior reciben el nombre de ciclo vesicular (Valtorta *et al.*, 1989; Betz y Bewick, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993; Sudhof, 1995; 2004). Los pasos del ciclo vesicular se describirán a continuación, comenzando por la fase exocitótica y haciendo especial mención a la preparación de vesículas para su fusión y a la fase endocitótica.

2.2.1-Exocitosis

El proceso que concluye con la fusión de las bicapas lipídicas de la vesícula y de la membrana de la zona activa tiene como protagonistas moleculares a las proteínas SNARE (del inglés *SNAP REceptors*) (Link *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1992; Fasshauer *et al.*, 1998b; Sudhof y Rizo, 2011; Jahn y Fasshauer, 2012). Las proteínas de la superfamilia SNARE son proteínas altamente conservadas desde un punto de vista evolutivo y que participan en numerosas vías de tráfico intracelular (Lewis *et al.*, 1997; Antonin *et al.*, 2002; Bonifacino y Glick, 2004; Jahn y Scheller, 2006). Estas proteínas contienen un motivo característico llamado dominio SNARE (Fasshauer *et al.*, 1998a) que es básicamente una estructura helicoidal. En la liberación de vesículas sinápticas son tres las proteínas SNARE con un papel esencial: la proteína de la vesícula sináptica sinaptobrevina o VAMP (del inglés *Vesicle Associated Membrane Protein*) (Trimble *et al.*, 1988; Baumert *et al.*, 1989), y las proteínas de la membrana plasmática Sintaxina-1 (Bennett *et al.*, 1992) y SNAP 25 (Oyler *et al.*, 1989). Además de su dominio SNARE,

la proteína Syntaxina posee un dominio adicional denominado Habc (Fernandez *et al.*, 1998) con importantes funciones en la regulación de la formación del complejo SNARE (Dulubova *et al.*, 1999; Fasshauer y Margittai, 2004; Dulubova *et al.*, 2007; Khvotchev *et al.*, 2007). El complejo SNARE que se forma entre proteínas de membrana plasmática y proteínas vesiculares supone un nexo físico entre la membrana presináptica y la vesicular confiriendo proximidad y posibilitando el proceso de fusión. Este es un complejo super-helicoidal constituido por cuatro hélices, dos de ellas son aportadas por la proteína SNAP 25, una es aportada por la proteína syntaxina y la restante por la proteína vesicular sinaptobrevina (Poirier *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 1998).

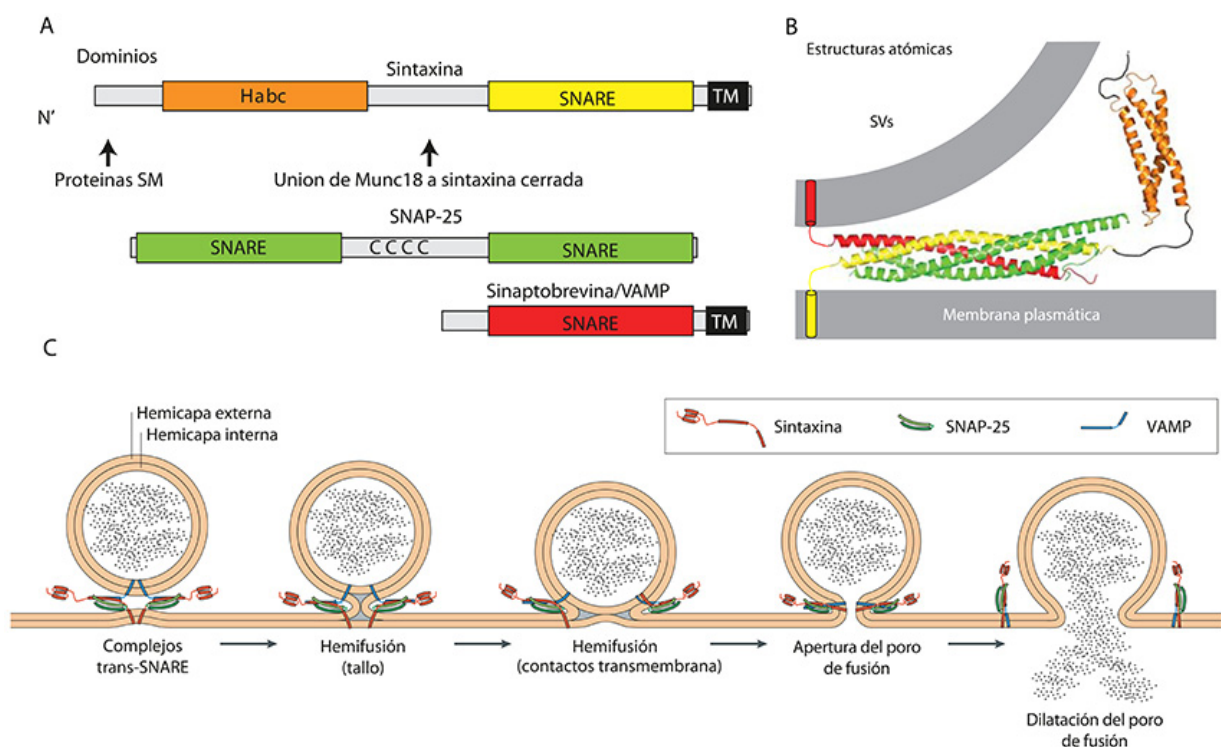


Figura 6- Proteínas SNARE implicadas en la fusión vesicular. Se ilustra el dominio modular de estas proteínas (A) y el modelo de estructura atómica (B) del complejo SNARE ensamblado. En C se recogen los principales eventos del proceso de fusión. Adaptado de (Sudhof y Rizo, 2011) y (Jahn y Scheller, 2006)

La formación del complejo SNARE se da principalmente mediante interacciones hidrofóbicas (Fasshauer *et al.*, 1998a) y en dirección de N a C terminal. El ensamblaje de este complejo es un proceso altamente exergónico, lo que confiere la energía de activación necesaria para la posterior fusión de las bicapas, por tanto, se puede definir al complejo SNARE como el verdadero motor molecular de la exocitosis (Sudhof y Rizo, 2011). Esta energía de activación se traduce en fuerzas de torsión que aproximan las membranas e inducen la curvatura necesaria para que suceda el evento de fusión (Jahn y Grubmuller, 2002; Kozlovsky y Kozlov, 2002; Jahn y Scheller, 2006).

2.2.2-Preparación de las vesículas

Previo al paso de fusión calcio dependiente de las vesículas sinápticas estas experimentan un proceso de preparación para su liberación. Este proceso puede ser explicado en dos pasos, un acercamiento espacial a las zonas donde se generan los microdominios de calcio en la zona activa, lo que se conoce con el nombre de amarre a la zona activa (del inglés *docking*) y un paso ulterior que permite el ensamblaje de complejos SNARE y recibe el nombre de preparación de las vesículas (del inglés *priming*) (Sudhof, 2012a). Existen cuatro proteínas crucialmente implicadas en el proceso de preparación de vesículas sinápticas, las ya mencionadas RIM1, Munc13 y Rab3 (o Rab27 (Yu *et al.*, 2008)), y la proteína de la familia SM (del inglés *Sec1/Munc18 like*) Munc18 (Hata *et al.*, 1993; Deak *et al.*, 2009). Tanto el ratón deficiente para la proteína Munc13 como el ratón deficiente para la proteína Munc18, muestran serios defectos en la exocitosis de vesículas sinápticas (Verhage *et al.*, 2000; Varoqueaux *et al.*, 2002). También se han observado defectos ultraestructurales en los ratones deficientes de Munc13 (Siksou *et al.*, 2009) y RIM1 (Kaesler *et al.*, 2011) y en

gusanos *Caenorhabditis elegans* carentes de la proteína Rab3 (Gracheva *et al.*, 2008), si bien es cierto, que este último defecto no ha sido observado en ratones carentes de esta proteína (Leenders *et al.*, 2001; Schluter *et al.*, 2004) a excepción de un estudio en el que se muestra un defecto en el número de vesículas ancladas a la zona activa en las sinapsis que inervan el diafragma de estos ratones (Coleman *et al.*, 2007). La ausencia de efecto en estos animales probablemente se deba a duplicaciones génicas compensatorias a lo largo de la escala evolutiva (Schluter *et al.*, 2004). En cualquier caso, los animales deficitarios para la proteína Rab3 muestran un severo defecto de reclutamiento de vesículas durante la estimulación del terminal presináptico, lo que sí parece tener un correlato ultraestructural (Leenders *et al.*, 2001). En cuanto a Munc18, se han encontrado defectos ultraestructurales en neuronas de ratones parcialmente carentes de esta proteína (heterocigotos) (Toonen *et al.*, 2006) así como en células β -pancreáticas de ratones totalmente carentes de ella (Oh *et al.*, 2012). Munc 13 parece tener un papel central en el *priming* por participar en un primer paso de acercamiento, y en el paso final de la preparación de la vesícula y la conferencia de competencia exocitótica plena (Jahn y Fasshauer, 2012). RIM también tiene importantes funciones en la preparación de las vesículas, pues es el determinante posicional que sitúa a las vesículas junto a los sitios de entrada de calcio gracias a su interacción con los canales de calcio (Wong y Stanley, 2010; Kaeser *et al.*, 2011) y con la GTPasa pequeña de vesícula Rab3 (Wang *et al.*, 1997; Dulubova *et al.*, 2005), e interviene en la activación de Munc13 por la formación de un complejo heterodimérico (Lu *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2011). Munc13 está sometida a una regulación adicional por calcio gracias a sus dominios C2 y por diacilglicerol gracias a su dominio C1 (Brose *et al.*, 1995; Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2011), lo que posibilita su reclutamiento a membrana. Finalmente, Munc18 parece guardar relación con los estadios finales del

proceso de preparación de las vesículas, por interaccionar con una forma semi-cerrada de la syntaxina1 (Dulubova *et al.*, 1999; Deak *et al.*, 2009) promoviendo el inicio de la formación del complejo SNARE (Shen *et al.*, 2007; Rathore *et al.*, 2010) y quizá evitando que el complejo SNARE ensamblado se interponga en la fusión de las bicapas lipídicas (Dulubova *et al.*, 2007). Por tanto, se podría contemplar el proceso de preparación de las vesículas como un proceso bifásico, en un primer estadio la unión GTP dependiente de Rab3 a RIM da pie a la formación de un complejo heterotrimérico entre Rab3 y el heterodímero previamente formado de RIM/Munc13 que ancla físicamente la vesícula a la zona activa. En un paso posterior, la activación de Munc13 por calcio y diacilglicerol, que conlleva su translocación, aproxima la vesícula a su sitio final de fusión y a continuación Munc18 iniciará la formación del complejo SNARE, confiriendo a la vesícula su competencia exocitótica plena.

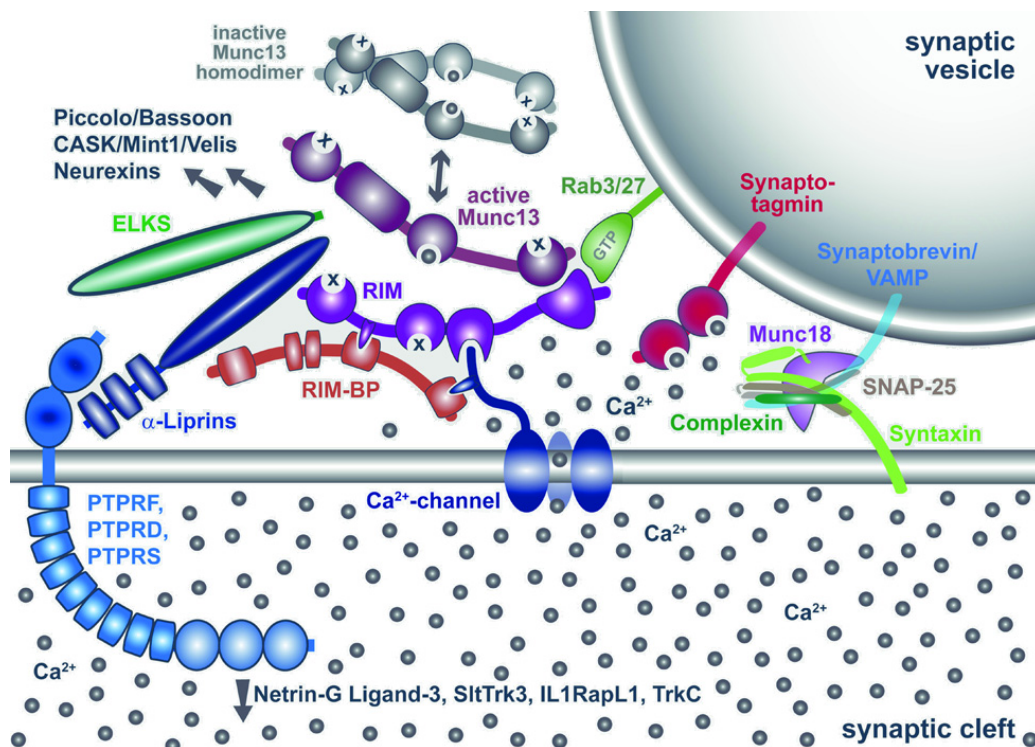


Figura 7- Esquema ilustrativo de la arquitectura de una zona activa. Obsérvese la importancia del heterotrimero RIM/Rab3/Munc13 en el posicionamiento y preparación de las vesículas sinápticas. Según modelos recientes, la complexina no entraría a formar parte del complejo SNARE hasta la entrada de calcio en el terminal presináptico, adaptado de (Sudhof, 2012b)

2.2.3-Fusión Calcio dependiente de las vesículas

Existen dos proteínas crucialmente implicadas en la fusión calcio dependiente de las vesículas sinápticas, la proteína de vesícula sináptica sinaptotagmina que actúa a modo de sensor de calcio para la exocitosis (Perin *et al.*, 1991a; Perin *et al.*, 1991b; Surkova y Grishin, 1991) y las complexinas (McMahon *et al.*, 1995; Ishizuka *et al.*, 1997), pequeñas proteínas citosólicas que se unen al complejo SNARE. La proteína sinaptotagmina posee dos dominios C2 de unión a calcio: C2A y C2B. Ambos se unen, de forma calcio-dependiente, a fosfolípidos ácidos y el dominio C2B posee una región que une membranas enriquecidas en Fosfatidil Inositol 4,5, Bisfosfato (PIP(4,5)₂) (Brose *et al.*, 1992; Davletov y Sudhof, 1993; Chapman y Jahn, 1994; Fukuda *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1996; Schiavo *et al.*, 1996). El papel del calcio en esta interacción parece ser disminuir las repulsiones electrostáticas entre los dominios C2 y las membranas aniónicas (Radhakrishnan *et al.*, 2009; McMahon *et al.*, 2010). Respecto a la función de las complexinas se ha postulado que pudiesen funcionar a modo de iniciador de la formación del complejo SNARE, promoviendo su ensamblaje y por tanto induciendo la fusión vesicular (Xue *et al.*, 2010), o bien funcionando como un freno molecular que se uniría y estabilizaría al complejo SNARE parcialmente ensamblado, liberándose de él ante la llegada del calcio, lo que permitiría el ensamblaje completo de dicho complejo y la consecuente fusión vesicular (Yang *et al.*, 2010; Kummel *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los datos ultraestructurales que revelan que las vesículas no están en contacto íntimo con las membranas de las zonas activas, si no separadas por unos pocos nanómetro (Siksou *et al.*, 2007; Fernandez-Busnadiego *et al.*, 2010), es plausible que el complejo SNARE no se forme hasta que la onda de calcio invada el terminal presináptico. Este dato sería incompatible con el papel de la complexina a modo de freno molecular del ensamblaje del complejo SNARE (Stein *et al.*, 2007; van

den Bogaart *et al.*, 2011) y por tanto lleva a pensar que las complexinas serían las últimas proteínas en entrar a formar parte del complejo de fusión (Jahn y Fasshauer, 2012). El esquema al que dan pie estas observaciones experimentales sería el siguiente. Tanto Munc13 como RIM intervendrían en un primer paso de posicionamiento de las vesículas en aposición a complejos SNARE (Syntaxina/SNAP25) previamente activados, posiblemente gracias a su unión con Munc18. En este estadio, la sinaptotagmina de la vesícula sináptica ya estaría unida a la membrana presináptica, bien por interacciones con el complejo SNARE, o bien por interacciones con membranas enriquecidas en $\text{PIP}(4,5)_2$ como es el caso de las membranas de las zonas activas (Micheva *et al.*, 2001). Es entonces cuando la entrada de calcio desencadena una serie de procesos que concluyen, a modo de cascada termodinámica, en la fusión de las vesículas sinápticas.

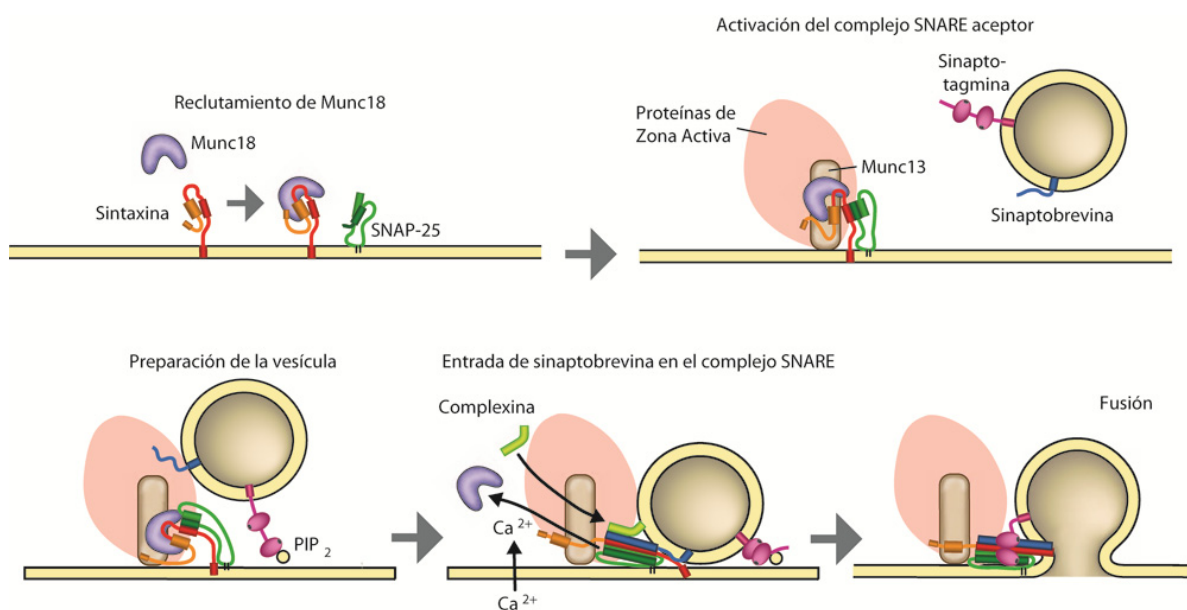


Figura 8- Dinámica del proceso de exocitosis y de preparación de las vesículas. Modelo ilustrativo de los pasos secuenciales de la fusión calcio dependiente. Munc18 sería responsable de la activación del SNARE aceptor, la sinaptotagmina posiciona la vesícula por unión al $\text{PIP}(4,5)_2$ y una vez el calcio invade la presinapsis, Munc18 se disocia del complejo SNARE. Es entonces cuando la sinaptobrevina se une al complejo SNARE y la complexina promueve su ensamblaje total (Jahn y Fasshauer, 2012)

La coordinación de los iones calcio a los sitios C2A y C2B de la sinaptotagmina induce en esta un cambio conformacional que aproxima la vesícula aun más a la membrana lo que permitiría la entrada de sinaptobrevina en el complejo SNARE; concomitantemente Munc18 es desplazado de su unión con el complejo SNARE y las complexinas promueven el ensamblaje total del mencionado complejo, ya que orientan correctamente la interacción syntaxina-sinaptobrevina. En este sentido, es difícil disociar los últimos pasos de la preparación de una vesícula sináptica de los primeros pasos del proceso de fusión, por ser ambos calcio dependientes. Este modelo pone de manifiesto que la regulación de la exocitosis se da mayoritariamente en los pasos previos al proceso de formación del complejo SNARE y por tanto a la fusión vesicular, por ser estas últimas reacciones altamente exergónicas. Este modelo asume que una vez que la sinaptobrevina de la membrana vesicular esté lo suficientemente cerca de un complejo SNARE preensamblado, acontecerá un evento exocitótico (Jahn y Fasshauer, 2012).

2.2.4-Endocitosis

La transmisión sináptica es un proceso biológico que requiere una elevada fidelidad en términos de frecuencia; en el caso de los terminales presinápticos, esto se traduce en mecanismos que permitan una correcta disponibilidad de vesículas ante estímulos que requieran una elevada frecuencia de liberación exocitótica de neurotransmisor. El principal mecanismo que limita la disponibilidad de nuevas vesículas en un terminal presináptico entre dos estímulos consecutivos es la endocitosis. El máximo exponente de este hecho es la primera sinapsis de las vías auditivas y visuales (las células ciliadas y los fotorreceptores, respectivamente) (von Gersdorff, 2001). El concepto de reciclamiento local de los fragmentos membranosos que experimentan fusión con la

membrana plasmática surge alrededor de 1970 mediante estudios con trazadores y técnicas de microscopía electrónica (Holtzman *et al.*, 1971; Heuser y Reese, 1973). Desde entonces se han descrito tres formas de endocitosis de vesículas sinápticas, la *endocitosis mediada por clatrina* (Bloom *et al.*, 1981; Heuser, 1989; Maycox *et al.*, 1992; Granseth *et al.*, 2007) la *endocitosis masiva* (del inglés *bulk endocytosis*) (Heuser y Reese, 1973; Wu y Wu, 2007; Clayton *et al.*, 2008) y la endocitosis que prosigue a los fenómenos de "*kiss&run*", proceso conocido en células no neuronales (Alvarez de Toledo *et al.*, 1993) y cuyo papel en neurotransmisión fue inicialmente propuesto por Fesce y colaboradores (Fesce *et al.*, 1994) y demostrado unos años más tarde (Stevens y Williams, 2000; Gandhi y Stevens, 2003; Park *et al.*, 2012), si bien es cierto que existe una gran controversia en torno a la mecánica de estos procesos (He *et al.*, 2006; Granseth *et al.*, 2007; He y Wu, 2007; Dittman y Ryan, 2009; Alabi y Tsien, 2013). En este último modo de exo/endocitosis la fusión vesicular no es completa y por tanto no se requiere una fisión vesicular estrictamente hablando, que siga al evento exocitótico. De los tres modos de endocitosis mencionados, el más relevante en lo que respecta al reciclamiento de vesículas sinápticas es la endocitosis mediada por clatrina (Granseth *et al.*, 2007; Saheki y De Camilli, 2012) sin embargo, el modo exacto de endocitosis que se pone en marcha en un terminal presináptico depende de numerosos factores, tales como la intensidad del estímulo que desencadena el evento exocitótico (Heuser y Reese, 1973; Perez Bay *et al.*, 2007; Wu y Wu, 2007; Clayton *et al.*, 2009), el tipo de neurona en el que se estudie este mecanismo (Granseth *et al.*, 2007), o el estadio de maduración o desarrollo en el que se encuentre la muestra biológica a estudiar (Bartolome-Martin *et al.*, 2012). Se hará especial mención a los procesos de endocitosis masiva y endocitosis mediada por clatrina, por ser la coexistencia de estos dos mecanismos uno de los objetos principales de estudio de este trabajo.

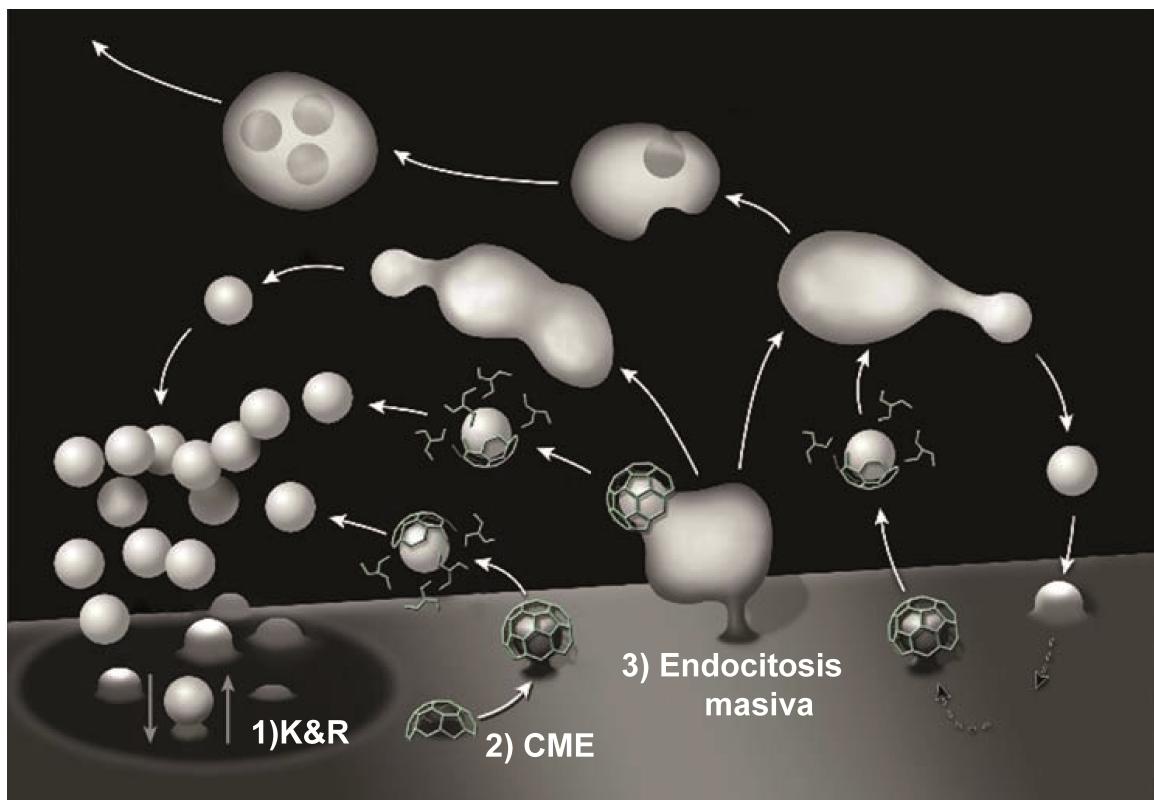


Figura 9- Endocitosis en un terminal presináptico. Se ilustran los tres modos de endocitosis previamente mencionados: 1) Kiss & Run; 2) Endocitosis mediada por clatrina y 3) Endocitosis masiva. Obsérvese que tanto la endocitosis mediada por clatrina como la endocitosis masiva tienen lugar en las zonas perisinápticas, adyacentes a los sitios de fusión. Adaptado de (Saheki y De Camilli, 2012)

2.2.4.1-Endocitosis mediada por clatrina

Tras experimentar el proceso de fusión con la membrana presináptica, la acción de distintas proteínas adaptadoras acaba rindiendo un intermediario membranoso recubierto de clatrina (Pearse, 1976; Maycox *et al.*, 1992); finalmente y tras el desensamblaje de esta cubierta de clatrina, se genera una nueva vesícula sináptica que podrá rellenarse con nuevas moléculas de neurotransmisor para ser liberada (Takei *et al.*, 1996; Cremona *et al.*, 1999; Dittman y Ryan, 2009). En las zonas perisinápticas, el reciclamiento mediado por clatrina tiene dos características que lo distinguen de este

mismo proceso en otros tejidos: la especificidad de la carga de proteínas contenida en una determinada fracción de membrana, lo que asegura la presencia de proteínas que tienen un bajo número de copias en las vesículas sinápticas (Takamori *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2012), y la velocidad del proceso (Dittman y Ryan, 2009; Saheki y De Camilli, 2012). Por ello, aparecen isoformas neuronales asociadas a las sinapsis de distintas proteínas que participan en este proceso que no están presentes en otros tejidos (Ferguson *et al.*, 2007; Saheki y De Camilli, 2012). La endocitosis mediada por clatrina comprende un paso inicial en el cual las proteínas adaptadoras se ensamblan en una determinada región de membrana enriquecida en PIP(4,5)₂ (Cremona *et al.*, 1999), lo que conlleva la invaginación de ese fragmento de membrana, etapa que se conoce con el nombre de nucleación de la malla de clatrina. Posteriormente y de forma cooperativa, se irán reclutando factores adicionales, junto con las distintas moléculas de clatrina que ayudarán a inducir la curvatura necesaria para la gemación de la vesícula sináptica. En un último paso, la GTPasa dinamina (Shpetner y Vallee, 1989; Obar *et al.*, 1990; Scaife y Margolis, 1990; Chen *et al.*, 1991; Baba *et al.*, 1995; De Camilli *et al.*, 1995; Hinshaw y Schmid, 1995; Takei *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 2007) lleva a cabo la fisión de la vesícula y, por último, la malla de clatrina es desensamblada de forma dependiente de la fosfatasa sinaptojanina (McPherson *et al.*, 1996; Ramjaun y McPherson, 1996), lo que rinde una nueva vesícula dispuesta para ser liberada una vez sea cargada con nuevas moléculas de neurotransmisor (Dittman y Ryan; Saheki y De Camilli, 2012). Los adaptadores de clatrina generalmente comprenden un módulo plegado de unión a membrana y una serie de brazos flexibles que terminan en dominios globulares (Edeling *et al.*, 2006). El módulo de unión a membrana acopla dominios presentes en las proteínas vesiculares llamados motivos endocitóticos y generalmente basados en tirosinas, así como las cabezas polares del PIP(4,5)₂ (Beck y Keen, 1991; Traub, 2003;

Owen, 2004), mientras que los brazos de estas moléculas unen las cadenas pesadas de la clatrina, así como otras moléculas adaptadoras y factores endocitóticos (Edeling *et al.*, 2006) que son proteínas accesorias a la malla de clatrina. Cabe destacar como molécula adaptadoras para el ensamblaje de la malla de clatrina, la proteína AP-2 (del inglés *adaptor protein 2*) (Smythe *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993) que interacciona con motivos ricos en tirosinas presentes en la proteína de vesícula SV2 (Schmied y Holtzman, 1987; Floor y Feist, 1989; Haucke y De Camilli, 1999) así como con motivos basados en dileucinas presentes en distintos transportadores de neurotransmisores (Fei *et al.*, 2008). Otro factor adaptador es la proteína AP-180 (Morris *et al.*, 1990), que interacciona con la proteína sinaptobrevina por medio del dominio SNARE de esta (Koo *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011). La proteína Stonina-2 (Martina *et al.*, 2001), homólogo de las proteínas Stoned-B de *Drosophila melanogaster* (Andrews *et al.*, 1996), es otro adaptador que forma un complejo con la proteína AP-2 e interacciona con la proteína vesicular sinaptotagmina, el sensor de calcio para la exocitosis (Zhang *et al.*, 1994; Walther *et al.*, 2001; Walther *et al.*, 2004; Willox y Royle, 2012; Kononenko *et al.*, 2013). Atendiendo a sus interacciones, queda claro que las principales funciones de las proteínas adaptadoras son la selección de la carga que se contiene en el fragmento de membrana que se ha de internalizar. La fuerza mecánica requerida para el proceso de gemación parece ser conferida por la clatrina, ya que el ensamblaje característico a modo de trisquel (Ungewickell y Branton, 1981), funciona como motor molecular principal de esta reacción (Kirchhausen, 2000). Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que numerosas proteínas, llamadas factores endocitóticos, podrían ayudar a la inducción de curvatura de las membranas (Ford *et al.*, 2002), funcionando la clatrina como un elemento propagador de la curvatura generada en primera instancia por los dominios BAR y F-BAR de estas proteínas accesorias (Itoh y De Camilli, 2006;

Ungewickell y Hinrichsen, 2007). A su vez este proceso es cooperativo, pues las proteínas generadoras de curvatura en membrana también detectan dicha curvatura uniéndose más eficientemente a membranas previamente curvadas (Antonny, 2006). Puesto que proteínas con distintos dominios BAR pueden inducir curvaturas que originan precursores endocitóticos con distintos diámetros, son unas buenas candidatas para la regulación de la forma de endocitosis que se pone en marcha ante una determinada estimulación (Peter *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2005; Clayton y Cousin, 2009). La proteína endofilina (Sparks *et al.*, 1996; Micheva *et al.*, 1997b) tiene un papel muy relevante en la inducción de curvatura, así como en la posterior sincronización de los eventos de fisión y desensamblado de la malla de clatrina (Ringstad *et al.*, 2001) por medio de sus interacciones con dinamina y sinaptojanina (Micheva *et al.*, 1997a; Ringstad *et al.*, 2001; Dickman *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2009). Otra proteína con dominios BAR es la amfifisina (Lichte *et al.*, 1992; David *et al.*, 1996; Di Paolo *et al.*, 2002) que también participa en el reciclamiento por inducir curvatura, si bien es cierto, que los ratones carentes de esta proteína, son capaces de reciclar vesículas sinápticas, aunque más lentamente (Di Paolo *et al.*, 2002; Pant *et al.*, 2009). La sindapina (Qualmann *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999) es una proteína accesoria con una peculiaridad, posee un dominio F-BAR, distinto al dominio canónico, N-BAR, que induce una curvatura más abierta de las membranas (Peter *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2007). Por este motivo se ha relacionado esta proteína con la endocitosis masiva y será discutida en dicho apartado (Clayton y Cousin, 2009). De forma paralela a la compleción del proceso de recubrimiento de la vesícula, se recluta en el tallo de la vesícula naciente, la GTPasa dinamina, principalmente por su interacción con endofilina (Ringstad *et al.*, 2001). La dinamina forma oligómeros en espiral en los cuellos de las vesículas y promueve la fisión final del intermediario endocitótico de la membrana

plasmática. Existen tres isoformas de dinamina, de las cuales la isoforma 1 y 3, son relevantes para el reciclamiento sináptico (Cao *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2007). La función de la dinamina queda puesta de manifiesto al analizar los defectos ultraestructurales de las sinapsis de animales carentes de esta enzima, cuyos intermediarios endocitóticos quedan bloqueados en el paso previo a la fisión de la vesículas (Koenig y Ikeda, 1989; Ferguson *et al.*, 2007; Raimondi *et al.*, 2011), o tras el uso de antagonistas farmacológicos tales como el Dynasore, inhibidor de la actividad GTPasa de la enzima (Macia *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2006). La actividad GTPasa de la dinamina es dependiente de dimerización del modulo donde reside dicha actividad, dado que la dinamina se ensambla formando anillos alrededor del cuello de las vesículas nacientes; esta dimerización de los dominios GTPasa solo se produce entre anillos paralelos. Finalmente, la hidrólisis de GTP aporta la fuerza contráctil necesaria para la escisión de la vesícula de la membrana plasmática (Gasper *et al.*, 2009; Chappie *et al.*, 2010; Chappie *et al.*, 2011; Ford *et al.*, 2011). El reclutamiento de dinamina a membrana ocurre únicamente en los pasos finales del proceso de invaginación (Merrifield *et al.*, 2002) y parece dependiente de la interacción de su dominio PH (del inglés *Pleckstrin Homology*) con membranas enriquecidas en PIP(4,5)₂, así como de las interacciones de su dominio C-terminal, rico en prolinas, con otros factores endocitóticos (Okamoto *et al.*, 1997; Shupliakov *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Szaszak *et al.*, 2002; Anggono y Robinson, 2007). Es importante destacar que las proteínas con dominios BAR encargadas de reclutar a la dinamina, como la endofilina, suelen interaccionar también con la fosfatasa sinaptojanina, lo que coordina el paso de fisión con el desensamblaje de la malla de clatrina (Micheva *et al.*, 1997b; Schuske *et al.*, 2003; Itoh y De Camilli, 2006). La sinaptojanina promueve la hidrólisis del PIP(4,5)₂ presente en la membrana vesicular, lo que parece limitar los sitios de unión de los adaptadores de

clatrina (Cremona *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2008). Paralelamente, la acción de la ATPasa Hsc70 y su cofactor auxilina (Guan *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2010) promueve el desensamblaje completo de la malla de clatrina, funcionando de manera sinérgica y haciendo del desensamblaje una reacción termodinámicamente catastrófica, lo que a su vez impide un re-ensamblaje espontáneo (Saheki y De Camilli, 2012). La fina regulación que requiere el proceso de endocitosis se da gracias a un ciclo de fosfoinosítidos que es paralelo al proceso endocitótico, en el cual sólo las membranas vesiculares en contacto con la membrana plasmática van a tener una elevada concentración de $\text{PIP}(4,5)_2$ (Di Paolo y De Camilli, 2006). La Fosfatidil Inositol Fosfato quinasade tipo 1γ (PIP 1γ) es la enzima sináptica responsable de la síntesis de PIP_2 (Wenk *et al.*, 2001) e interacciona con la proteína AP-2 (Krauss *et al.*, 2006). Esta interacción es responsable del reclutamiento de la quinasa a los centros de nucleación de la malla de clatrina. Finalizado el proceso de fisión, la fosfatasa sinaptojanina es reclutada a las membranas gracias a sus interacciones con endofilina (Ringstad *et al.*, 2001) donde disminuye los niveles de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ promoviendo la desaparición de sitios de unión para los adaptadores de clatrina, y la aparición de sitios de unión para auxilina (Guan *et al.*, 2010). Una vez desensamblada la cubierta de clatrina se discute si la vesícula va a experimentar un paso de fusión con un endosoma terminal (Wucherpfennig *et al.*, 2003; Rizzoli *et al.*, 2006), o bien si elude esta estación de relevo (Saheki y De Camilli, 2012).

2.2.4.2-Endocitosis masiva

La endocitosis masiva, término que proviene del inglés *Bulk endocytosis*, hace referencia a aquellos modos de recuperación de membrana que se ponen en marcha tras estimulaciones de alta frecuencia, donde un gran número de vesículas se fusionan con la membrana plasmática, generando intermediarios endocitóticos de gran diámetro (Heuser y Reese, 1973; Miller y Heuser, 1984; Shupliakov *et al.*, 1997; Harata *et al.*, 2001; Paillart *et al.*, 2003; Clayton *et al.*, 2007; Perez Bay *et al.*, 2007; Wu y Wu, 2007; Clayton *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010; Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Wenzel *et al.*, 2012). La función prioritaria de este tipo de endocitosis no es la redistribución de vesículas inmediata, sino la de prevenir un incremento de superficie de membrana deletéreo para el terminal presináptico (Clayton y Cousin, 2009). Los modelos empleados para explicar este tipo de endocitosis asumen que la endocitosis mediada por clatrina tienen una tasa de saturación o capacidad de carga (Sankaranarayanan y Ryan, 2000); una vez rebasado ese umbral, se dispararían los mecanismos que ponen en marcha la endocitosis masiva (Clayton y Cousin, 2009). El destino final de los endosomas que se generan a partir de este tipo de endocitosis parece ser su futura gemación para rendir nuevas vesículas (Teng *et al.*, 2007; Clayton *et al.*, 2008; Clayton *et al.*, 2009), si bien este es un tema controvertido, pues en algunos casos se ha descrito que los endosomas se acumulan sin rendir nuevas vesículas (Perez Bay *et al.*, 2007; Bartolome-Martin *et al.*, 2012) y existen discrepancias en la bibliografía acerca de los tiempos de regeneración de vesículas (Clayton *et al.*, 2008; Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Cheung y Cousin, 2013). La gemación de nuevas vesículas desde estos endosomas parece guardar relación con los adaptadores de clatrina AP-1 y AP-3 (Cheung y Cousin, 2012) pero parece ser un mecanismo independiente de dinamina (Ferguson *et al.*, 2007; Saheki y De Camilli, 2012). Se ha propuesto que la endocitosis

masiva pueda ser una reminiscencia de mecanismos endocitóticos que tienen lugar durante la guía axonal, pues aparece asociado a las vastas remodelaciones de membrana que tienen lugar en el cono axónico (Bonanomi *et al.*, 2008). La terminación de este tipo de endocitosis es otro punto controvertido; mientras algunos autores sostienen que la endocitosis no continúa al finalizar la estimulación (Clayton *et al.*, 2008), también existen evidencias que muestran que los endosomas formados durante este tipo de endocitosis, permanecen unidos con el espacio extracelular después de la estimulación (Ferguson *et al.*, 2007; Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Cheung y Cousin, 2013). El mecanismo molecular por el que se pone en marcha este tipo de endocitosis es solo parcialmente conocido, pero la regulación por calcio y por la fosfatasa dependiente de calmodulina, calcineurina (Proteína Fosfatasa 2 B) parece ser de crucial importancia (Cousin y Robinson, 2001; Wu *et al.*, 2009), si bien es cierto que los efectos del calcio en la puesta en marcha de este tipo de endocitosis son difíciles de evaluar por ser el calcio el inductor de todos los tipos de endocitosis en un terminal presináptico (Marks y McMahon, 1998; Wu *et al.*, 2009). En cualquier caso se ha demostrado que un ciclo de defosforilaciones/refosforilaciones de la proteína dinamina acompaña a los fenómenos de endocitosis masiva (Tan *et al.*, 2003; Clayton *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010) y en este caso, la defosforilación parece mediada por la fosfatasa calcineurina actuando esta en ese caso como sensor de la estimulación prolongada (Clayton y Cousin, 2009). Además, la calcineurina parece estar implicada también en el proceso de gemación de nuevas vesículas desde los endosomas (Cheung y Cousin, 2013). A pesar de que la mayoría de eventos moleculares que han sido caracterizados en torno a los fenómenos de endocitosis masiva integran a la dinamina, esta enzima parece prescindible para la formación de estructuras endosomales tras la estimulación, pues se ha observado su formación en ausencia de dinamina 1, la principal isoforma neuronal

(Ferguson *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008) y durante la inhibición farmacológica de su actividad GTPasa (Bartolome-Martin *et al.*, 2012). Sin embargo, la interacción dependiente de fosforilación con la proteína Sindapina, que contiene dominios F-BAR, parece determinante a la hora de iniciar estos procesos (Anggono y Robinson, 2007; Clayton y Cousin, 2009), lo que parece conferir a la dinamina una función más posicional que catalítica en la endocitosis masiva. La dinamina sufre un ciclo de fosforilación/desfosforilación en sus Serina 774 y 778, durante los fenómenos de endocitosis masiva (Tan *et al.*, 2003; Clayton *et al.*, 2009; Clayton *et al.*). En este ciclo, la fosfatasa calcineurina parece promover, de forma dependiente de la entrada de calcio en el terminal, la desfosforilación de las Serinas 774 y 778 de la dinamina 1 (Clayton y Cousin, 2009; Clayton *et al.*, 2010), lo que, a su vez, llevaría a su interacción con sindapina 1 y desencadenaría la recuperación masiva de la membrana presináptica. Tras la estimulación, la dinamina se refosforila en dos pasos, el primero de ellos mediado por Cdk5 en la S778 (Anggono y Robinson, 2007; Clayton *et al.*, 2010) y el siguiente, estrictamente dependiente del anterior, sería llevado a cabo por Gsk3 en la S774 (Clayton *et al.*, 2010). La interacción con la proteína intersectina parece ser importante en el modo de endocitosis masiva. De hecho, cuando se impide la interacción de la intersectina con la dinamina se ponen en marcha preferentemente mecanismos de endocitosis masiva durante la estimulación neuronal (Winther *et al.*, 2013). Es conocido que las membranas de los endosomas que participan en el reciclamiento masiva son algo más hidrofóbicas que las membranas de las vesículas que rinde la endocitosis mediada por clatrina (Clayton *et al.*, 2008; Bartolome-Martin *et al.*, 2012), lo que podría guardar relación con diferencias en la composición lipídica de las membranas de los distintos tipos de orgánulos o en la cantidad relativa de proteínas contenidas en dichas membranas.

2.3-Los "pools" de vesículas sinápticas

En un terminal presináptico existen distintos tipos de vesículas, en función de su susceptibilidad a experimentar un proceso de fusión ante la llegada de un estímulo al terminal. Las vesículas con distintas probabilidades de ser liberadas se agrupan en lo que se denomina "pools" de vesículas sinápticas (Rizzoli y Betz, 2005). La idea de la existencia de estos grupos de vesículas se sugirió al observar que en ganglios simpáticos de gato existían dos componentes de liberación de neurotransmisor: uno listo para ser liberado ante la llegada estimulación y otro algo más reticente a la liberación (Birks y Macintosh, 1957; Birks y Fitch, 1974). Se recomienda hacer una clasificación en tres grupos: las vesículas cuya liberación es inmediata o RRP (del inglés *Readily Releasable Pool*), las vesículas que se movilizan durante la estimulación, contribuyendo a la exocitosis y por tanto a la liberación de neurotransmisor, que constituyen el "pool" de reciclamiento y por último aquellas vesículas que no se movilizan y por tanto no contribuyen a la liberación de neurotransmisor, que conforman el "pool" de reserva (Alabi y Tsien, 2012). Las vesículas del RRP, parecen estar amarradas a la zona activa y molecularmente preparadas para su liberación (Rosenmund y Stevens, 1996; Schneggenburger *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2003). La liberación de estas vesículas se puede inducir con estimulaciones mínimas o mediante perfusión de una solución hipertónica de sacarosa (Rosenmund y Stevens, 1996), lo que es coherente con el modelo de fusión vesicular en el que el complejo SNARE no está pre-ensamblado (Jahn y Fasshauer, 2012). El *pool de reciclamiento* está constituido por las vesículas que mantienen la neurotransmisión durante un tren de potenciales de acción (Richards *et al.*, 2003) o aquellas vesículas que experimentan procesos de exo/endocitosis en una ventana temporal relativamente corta, en sinapsis de animales vivos (Denker *et al.*, 2011a). Por regla general este pool no supera el 15 % de las vesículas contenidas en un

determinado compartimento presináptico. Finalmente el *pool de reserva* está formado por vesículas que no participan en la neurotransmisión durante estimulaciones de baja frecuencia y cuya movilización sólo es conseguida al emplear altas frecuencias de estimulación (Kuromi y Kidokoro, 2000; Rizzoli y Betz, 2005), este parece estar constituido por un 80-90 % de las vesículas de un terminal sináptico, si bien es cierto que mediante experimentos en los que se puede determinar una medida acumulada de la exocitosis, se ha demostrado que posiblemente estas vesículas constituyan un 50-60% del total de vesículas (Kim y Ryan, 2010). Cabe destacar que el porcentaje aproximado de vesículas pertenecientes a uno u otro de los citados pools varía en función de la aproximación metodológica empleada para su determinación; mientras que por medio de técnicas de microscopía electrónica se ha determinado que el porcentaje de vesículas del "pool" de reciclamiento no supera el 20% en la mayoría de preparaciones (Kuromi y Kidokoro, 2000; Richards *et al.*, 2003; Rizzoli y Betz, 2005; Alabi y Tsien, 2012), mediante técnicas de imagen con pHluorinas en rodajas de cerebro (Rose *et al.*, 2013) y medidas de capacitancia (Xue *et al.*, 2013), se ha descrito recientemente que la práctica totalidad de vesículas de un terminal presináptico experimentan procesos de fusión con la membrana plasmática en condiciones fisiológicas y participan, por tanto, en la neurotransmisión. Probablemente el porcentaje relativo de cada uno de estos "pools" sufra modificaciones durante el desarrollo (Rose *et al.*, 2013). Se discute si son determinantes moleculares intrínsecos a las vesículas sinápticas (Hua *et al.*, 2011; Ramirez y Kavalali, 2012) o por el contrario, características posicionales (Holderith *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012) las que definen que una vesícula pertenezca a uno u otro de los mencionados pools. Se ha descrito que las vesículas del pool de reserva pudiesen funcionar como un reservorio de proteínas sinápticas (Denker *et al.*, 2011b). En cualquier caso la tasa de recambio entre estos grupos de vesículas, así como la

regulación de la incorporación en uno u otro de los pools constituye una línea de investigación importante en la fisiología sináptica. Se ha encontrado que las actividades de fosforilación/desfosforilación llevadas a cabo por Cdk5/Calcineurina, sobre un sustrato aún por identificar, podrían regular la dinámica de estos pools, siendo la actividad de Cdk5 favorable a la incorporación de vesículas en el pool de reserva y mediando la calcineurina las acciones opuestas (Kumashiro *et al.*, 2005; Kim y Ryan, 2010; Mitra *et al.*, 2012). En los últimos años se ha observado que algunas vesículas pueden compartirse entre terminales presinápticos, lo que ha dado pie a la aparición de un nuevo concepto, el "superpool" de vesículas. Los mecanismos que rigen la dinámica de estas vesículas son solo parcialmente conocidos (Darcy *et al.*, 2006; Ratnayaka *et al.*, 2011; Orenbuch *et al.*, 2012) si bien son un atractivo correlato celular al concepto de redistribución de pesos sinápticos.

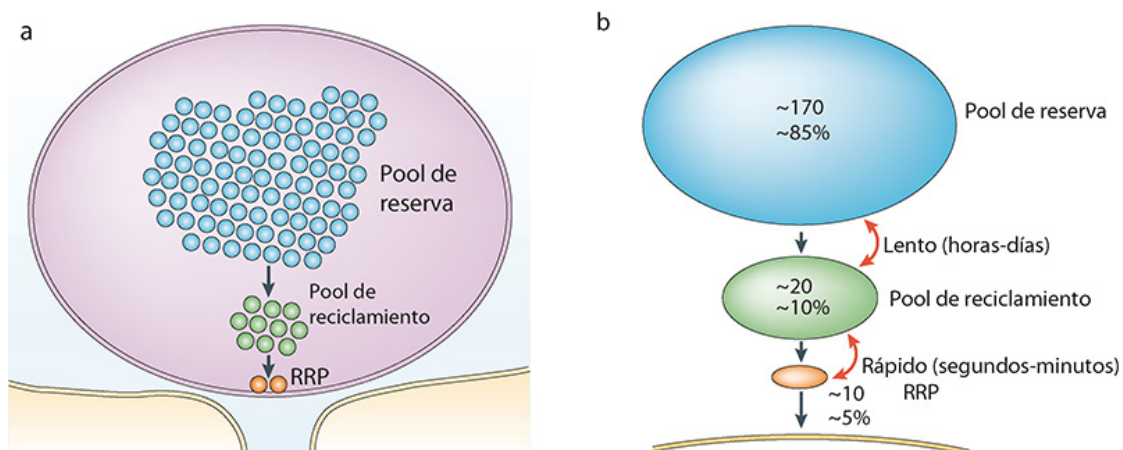


Figura 10- a) Esquema ilustrativo de la distribución de los distintos pools de vesículas sinápticas en un terminal de SNC de rata. b) Proporciones de los distintos pools de vesículas sinápticas, las flechas rojas aluden a la tasa de intercambio entre los distintos pools. Adaptado de (Rizzoli y Betz, 2005)

3- El sistema endocannabinoide

Los endocannabinoides son mensajeros retrógrados dependientes de actividad (Kreitzer y Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson y Nicoll, 2001) ampliamente implicados en el control de la neurotransmisión en el SNC de mamíferos (Chevalleyre *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2009). Los elementos del denominado sistema endocannabinoide comprenden: las moléculas mensajeras 2-Araquidonil Glicerol (2-AG) y Araquidonil Etanol Amida o anandamida (AEA); las enzimas de síntesis, la Fosfolipasa D (PLD) y la DiAcilGlicerol Lipasa α (DGL α); las enzimas de degradación MonoacilGlicerol Lipasa (MGL) y la Amido Hidrolasa de Ácidos Grasos (FAAH del inglés *Fatty Acid Amido Hidrolase*) y los receptores activados por dichos endocannabinoides, CB1R y CB2R (Kano *et al.*, 2009).

3.1-Síntesis de endocannabinoides

La anandamida fue aislada por primera vez del encéfalo porcino en 1992 (Devane *et al.*, 1992) y su producción, dependiente de calcio extracelular y actividad en neuronas, se descubrió a los pocos años (Di Marzo *et al.*, 1994). Las dos enzimas que participan secuencialmente en la síntesis de anandamida son la N-Acil transferasa y la PLD, ambas son sensibles a calcio (Kano *et al.*, 2009), lo que promueve la síntesis de este mensajero tras la entrada de calcio en la neurona. El ratón carente de la enzima PLD no muestra alteraciones comportamentales evidentes, y se piensa que en estos animales la anandamida podría sintetizarse por una ruta alternativa (Leung *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2007). Este hecho, junto con las bajas concentraciones de este metabolito en el encéfalo, hace pensar que este endocannabinoide pueda ser menos relevante que el 2-AG en la modulación de la neurotransmisión mediada por endocannabinoides (Kano *et*

al., 2009). El 2-AG fue aislado por primera vez del aparato digestivo canino (Mechoulam *et al.*, 1995) y posteriormente del encéfalo de rata (Sugiura *et al.*, 1995). En su síntesis parecen intervenir secuencialmente dos enzimas, la fosfolipasa C de tipo β (PLC β) (Maejima *et al.*, 2005) y la DGL α (Yoshida *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010; Tanimura *et al.*, 2010). La síntesis de 2-AG puede inducirse en respuesta a estimulaciones que provoquen un aumento transitorio de calcio, presumiblemente por la activación calcio dependiente de las enzimas de síntesis (Bisogno *et al.*, 1997; Stella *et al.*, 1997; Stella y Piomelli, 2001; Straiker y Mackie, 2005), en respuesta a la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I (Maejima *et al.*, 2001; Varma *et al.*, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Galante y Diana, 2004) o de forma sinérgica en respuesta a la coincidencia entre ambos tipos de estímulo (Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Brenowitz y Regehr, 2003; Brown *et al.*, 2003; Hashimotodani *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005). La síntesis de endocannabinoides, por tanto, podría tener la función de detector de coincidencias cuando se pone en marcha por el último mecanismo de los previamente mencionados; una de las señales induciría la entrada de calcio y la otra la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (y por tanto de la FosfolipasaC de tipo β). El verdadero detector de coincidencias sería la PLC- β por exhibir calcio dependencia y susceptibilidad a la activación por la vía de señalización de mGluR1 (Hashimotodani *et al.*, 2005; Hashimotodani *et al.*, 2007)

3.2-Receptores de cannabinoides

Se han caracterizado dos receptores de cannabinoides, el receptor CB1 y el receptor CB2. Las principales acciones sinápticas de los endocannabinoides se atribuyen al receptor CB1 por ser este el más expresado en el sistema nervioso central (Herkenham

et al., 1990; Herkenham *et al.*, 1991; Kawamura *et al.*, 2006). No obstante, se ha demostrado la existencia del receptor CB2 (Munro *et al.*, 1993), así como su relevancia fisiológica, en el sistema nervioso central de mamíferos (Skaper *et al.*, 1996; Van Sickle *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2012; den Boon *et al.*, 2012) y en cultivos neuronales (Trazzi *et al.*, 2010). Sin embargo, y debido a que en este estudio se presta especial atención a procesos inhibitorios mediados por el receptor CB1, se obviará al receptor CB2 en esta introducción. El receptor CB1 se fue caracterizado en 1990 (Gerard *et al.*, 1990; Matsuda *et al.*, 1990) y ese mismo año se demostró su abundante expresión en sistema nervioso central (Herkenham *et al.*, 1990). Su localización en terminales presinápticos (Nyiri *et al.*, 2005; Katona *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2006; Puente *et al.*, 2010) hace pensar que ejerce funciones importantes en el control de la liberación de neurotransmisor (Freund *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2012). El receptor CB1 es un receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas con una longitud de 473 aminoácidos (Herkenham *et al.*, 1990) que, a diferencia de otros receptores de 7 hélices transmembrana y debido a la naturaleza hidrofóbica del ligando, alberga el sitio de unión de los cannabinoides en la región transmembrana (Song y Bonner, 1996). Los cannabinoides acceden al sitio de unión a ligando gracias a movimientos de difusión lateral en la membrana (Makriyannis *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005). Se ha propuesto que en vivo, el receptor CB1 nativo podría presentarse formando homodímeros (Wager-Miller *et al.*, 2002) como otros GPCRs (del inglés *G-Protein Coupled Receptors*) (Maggio *et al.*, 1993), y en este caso la homodimerización del receptor parece dependiente de su interacción con el agonista (Mackie, 2005). Otra posibilidad es la heterodimerización del receptor CB1 con otros receptores metabotrópicos (Mackie, 2005), como la interacción descrita con el receptor D2 de dopamina. La heterodimerización en este caso modifica las características de señalización del receptor

monomérico (Kearn *et al.*, 2005). La activación del receptor CB1 media efectos inhibitorios sobre la liberación de neurotransmisor (Shen *et al.*, 1996; Levenes *et al.*, 1998; Schlicker y Kathmann, 2001; Godino *et al.*, 2005) dependientes de proteínas G (Pitler y Alger, 1994; Sim *et al.*, 1996; Pertwee, 1997) gracias a dos mecanismos principalmente: I) la alteración de la conductancia iónica de las membranas bien por inhibición directa de canales de calcio voltaje dependientes por la acción del dímero $\beta\gamma$ (Twitchell *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001; Kreitzer y Regehr, 2001; Wilson y Nicoll, 2001; Brown *et al.*, 2004), bien por activación de canales rectificadores de potasio (Mackie *et al.*, 1995; Daniel y Crepel, 2001; Daniel *et al.*, 2004; Guo y Ikeda, 2004), lo que disminuye la excitabilidad del compartimento presináptico (Chevaleyre *et al.*, 2006) y II) la disminución de los niveles de cAMP dependiente de la acción de la subunidad α_i de proteínas G sobre la Adenilato Ciclasa (AC) (Howlett *et al.*, 1986; Vogel *et al.*, 1993; Childers y Deadwyler, 1996; Chevaleyre *et al.*, 2007) lo que conlleva una disminución de los niveles de actividad de las enzimas reguladas por cAMP. Clásicamente se ha considerado a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) como la mediadora de los efectos de los endocannabinoides (Chevaleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Heifets y Castillo, 2009) si bien es cierto que otras proteínas reguladas por cAMP podrían ser las responsables de dichos efectos (Seino y Shibasaki, 2005; Bos, 2006; Gekel y Neher, 2008; Branham *et al.*, 2009; Tsetsenis *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Se ha postulado que la alteración de la conductancia iónica de la membrana presináptica está relacionada con la plasticidad a corto plazo, mientras que la disminución de los niveles de cAMP y los consecuentes cambios en la maquinaria de liberación se asocian a mecanismos de depresión sináptica a largo plazo (Schoch *et al.*, 2002; Heifets y Castillo, 2009; Castillo *et al.*, 2012). Por otra parte, recientemente se ha propuesto la presencia del receptor CB1 y su capacidad

de señalización en orgánulos intracelulares (Brailoiu *et al.*, 2011). En concreto el receptor CB1 está presente en mitocondrias, donde parece regular el metabolismo energético neuronal, pudiendo esto contribuir a sus funciones en plasticidad sináptica (Benard *et al.*, 2012).

3.3-Degradación

Los cannabinoides son degradados en dos pasos secuenciales, un primer paso de hidrólisis y un segundo paso de oxidación (Vandevorde y Lambert, 2007). Las enzimas que catalizan estas reacciones son distintas en función del cannabinoide a degradar. La enzima responsable de la hidrólisis de la anandamida es la FAAH (Cravatt *et al.*, 1996; Cravatt *et al.*, 2001) y la enzima responsable de la hidrólisis del 2-AG es la MGL (Törnqvist y Belfrage, 1976; Karlsson *et al.*, 1997; Dinh *et al.*, 2002; Dinh *et al.*, 2004; Blankman *et al.*, 2007). Posteriormente el ácido araquidónico que se genera en estas reacciones es oxidado por las enzimas Ciclo OXigenasa (COX) y Lipo OXigenasa (LOX) entrando en las rutas de síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. El 2-AG puede ser oxidado directamente por determinadas isoformas de COX y tanto el 2-AG como la anandamida son susceptibles a la oxidación por LOX's (Vandevorde y Lambert, 2007; Kano *et al.*, 2009). Mientras que la distribución de la enzima FAAH es casi exclusivamente postsináptica, la de la MGL es presináptica (Gulyas *et al.*, 2004), este hecho podría guardar relación con la posible función de la anandamida a modo de señalizador postsináptico, vía la activación de receptores TRPV1 (Grueter *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2011).

3.4-Plasticidad mediada por cannabinoides

3.4.1-Plasticidad a corto plazo: DSI y DSE

La plasticidad a corto plazo mediada por endocannabinoides de forma retrograda se puso de manifiesto por primera vez en sinapsis inhibitorias, con la demostración de la Supresión de la Inhibición inducida por Despolarización (DSI) (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson y Nicoll, 2001; Yoshida *et al.*, 2002) y posteriormente en la Supresión de la Excitación inducida por Despolarización (DSE) (Kreitzer y Regehr, 2001), aunque probablemente el mecanismo de DSI se caracterizó unos diez años antes, si bien no se identificó al mensajero responsable de este fenómeno (Llano *et al.*, 1991; Pitler y Alger, 1992; 1994). Ambas formas de plasticidad se manifiestan en una supresión transitoria de la liberación de neurotransmisor por parte de la neurona presináptica, de modo que si esta neurona es glutamatérgica el fenómeno desencadenado será la DSE, mientras que si es GABAérgica se le denominará DSI (Kano *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2012). Tanto la DSI como la DSE requieren un pulso despolarizante de la membrana postsináptica (generalmente se despolariza la membrana postsináptica hasta 0 mV), que promueva la entrada de calcio, que pondrá en marcha la producción del mensajero retrógrado por activación de sus enzimas sintéticas, que son dependientes de calcio (Brenowitz y Regehr, 2003; Maejima *et al.*, 2005; Brenowitz *et al.*, 2006). La síntesis de endocannabinoides también puede ser inducida por activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas $G_{q/11}$ y la subsiguiente estimulación de la PLC β . Por norma general este mecanismo se asocia a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 1 (Maejima *et al.*, 2001; Varma *et al.*, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; Kushmerick *et al.*, 2004) aunque la estimulación de otros receptores metabotrópicos, como por ejemplo los receptores M1 y M3 muscarínicos, también parece desencadenar la producción de estos mensajeros por la activación de su

ruta de síntesis (Kim *et al.*, 2002; Fukudome *et al.*, 2004). Investigaciones recientes sugieren, que tanto la síntesis dependiente de la entrada de calcio como la síntesis dependiente de la activación de receptores metabotrópicos podrían funcionar de forma conjunta, ya que se ha observado un sinergismo entre ambas rutas, manifestado en una facilitación de liberación del mensajero retrogrado (Varma *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002). En este contexto la síntesis de endocannabinoides funcionaría detectando coincidencias, bien temporales (en el caso de recibir dos estímulos de la misma naturaleza neuroquímica en un periodo breve de tiempo) (Brenowitz y Regehr, 2003; Maejima *et al.*, 2005), o bien neuroquímicas, en el caso de recibirse distintas aferencias sobre una misma neurona postsináptica (Kim *et al.*, 2002). La proteína que funcionaría como el verdadero detector de coincidencias en este caso sería la PLC β ya que exhibe calcio dependencia y es susceptible de activación por proteínas G $_{q/11}$ (Brenowitz y Regehr, 2003; Hashimotodani *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005). Además, el ratón carente de la enzima PLC β no muestra sinergismo en la síntesis de endocannabinoides ante la combinación de ambos tipos de estimulación (Maejima *et al.*, 2005). Una vez generado, el diacilglicerol se metaboliza a 2-AG por acción de la DGL α (Szabo *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). Se ha sugerido que este mecanismo sinérgico pueda subyacer también a la síntesis de endocannabinoides requerida para los procesos de LTD (Safo y Regehr, 2005). De hecho, la LTD en las neuronas de Purkinje se puede inducir por la activación concomitante de las fibras paralelas y las trepadoras (Ito, 2001), lo que parece indicar que la liberación de cannabinoides que da origen a estos fenómenos es atribuible a la sinergia entre ambas rutas de síntesis (Hashimotodani *et al.*, 2007). Durante los procesos de DSI y DSE la activación de los receptores CB1 da lugar principalmente a una disminución de la entrada de calcio en el terminal presináptico por inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (Lenz *et al.*,

1998; Kreitzer y Regehr, 2001; Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Wilson y Nicoll, 2001; Varma *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Godino *et al.*, 2005; Safo *et al.*, 2006)

3.4.2-Plasticidad a largo plazo, LTD

La primera vez que se demostró la implicación del sistema endocannabinoide en la LTD presináptica fue en el año 2002 en el estriado dorsal (Gerdeman *et al.*, 2002), desde entonces se ha demostrado su implicación en procesos de depresión a largo plazo en numerosas regiones encefálicas tales como la amígdala (Marsicano *et al.*, 2002), el núcleo accumbens (Robbe *et al.*, 2002), el hipocampo (Chevaleyre y Castillo, 2003; Yasuda *et al.*, 2008), distintas regiones de corteza (Sjostrom *et al.*, 2003; 2004; Huang *et al.*, 2008), el cerebelo (Safo y Regehr, 2005; Soler-Llavina y Sabatini, 2006; Qiu y Knopfel, 2009; Carey *et al.*, 2011), el área tegmental ventral (Pan *et al.*, 2008) o los colículos superiores (Henneberger *et al.*, 2007). A diferencia de en la DSI o en la DSE, el principal efecto de los endocannabinoides en la inducción de la LTD es una disminución de los niveles de cAMP del terminal presináptico (Howlett *et al.*, 1986; Childers y Deadwyler, 1996; Chevaleyre y Castillo, 2003; Chevaleyre *et al.*, 2006; Chevaleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Heifets y Castillo, 2009), aunque también se ha propuesto a la calcineurina como mediadora de la LTD inhibitoria inducida por endocannabinoides en ciertas interneuronas hipocámpales (Heifets *et al.*, 2008). Llegados a este punto es importante mencionar que mientras los procesos de plasticidad a corto plazo son totalmente dependientes del sistema endocannabinoide, durante los procesos de LTD, sólo la fase de inducción es dependiente del sistema endocannabinoide (Safo y Regehr, 2005; Singla *et al.*, 2007; Heifets *et al.*, 2008;

Heifets y Castillo, 2009; Castillo *et al.*, 2012). La aplicación de un agonista cannabinoide por sí sola no es suficiente para provocar una depresión sostenida de la liberación de neurotransmisor (Sjostrom *et al.*, 2003; Ronesi *et al.*, 2004; Safo y Regehr, 2005; Bender *et al.*, 2006) y parece ser que se requiere la activación de la neurona aferente, de forma concomitante a la exposición al endocannabinoide, para que este pueda inducir una LTD sostenida (Adermark y Lovinger, 2007; Singla *et al.*, 2007; Heifets *et al.*, 2008). El significado fisiológico de esta forma de LTD podría ser el de conferir especificidad a aquellas sinapsis que han de experimentar el proceso de depresión (Singla *et al.*, 2007; Heifets *et al.*, 2008) pero, a día de hoy, el mecanismo molecular subyacente a este fenómeno no ha sido esclarecido a día de hoy (Castillo *et al.*, 2012). Los tiempos de activación del receptor CB1 requeridos para la inducción de la LTD son mucho mayores que los requeridos para la inducción de la DSI o la DSE (Chevalleyre y Castillo, 2003; Ronesi *et al.*, 2004), lo que explica parcialmente el requerimiento de una actividad presináptica sostenida para el mantenimiento de la LTD (Singla *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la activación de receptores NMDA presinápticos podría ser la responsable del mantenimiento de la LTD (Sjostrom *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2006; Nevian y Sakmann, 2006; Corlew *et al.*, 2007; Rodriguez-Moreno y Paulsen, 2008). Esta activación promovería una entrada de calcio en el terminal presináptico, hecho que contrasta con las formas de plasticidad a corto plazo en las que el principal efecto de los endocannabinoides es una inhibición transitoria de los canales dependientes de voltaje (Kreitzer y Regehr, 2001) y con formas de LTD que se manifiestan en una inhibición sostenida de los canales de calcio dependientes de voltaje (Pelkey *et al.*, 2006; Mato *et al.*, 2008; Qiu y Knopfel, 2009). El calcio entrante por los receptores NMDA podría ser responsable de la activación de la fosfatasa calcineurina, requerida para el mantenimiento de la LTD de ciertas interneuronas (Heifets *et al.*,

2008) o de la síntesis de óxido nítrico (NO) por activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) presináptica, que viajaría de forma ortodrómica al compartimento postsináptico, promoviendo allí el mantenimiento de la LTD (Ito, 2001; Safo y Regehr, 2005). El requerimiento del óxido nítrico para el mantenimiento de la depresión a largo plazo es especialmente relevante en la LTD cerebelar de la sinapsis establecida entre la fibra paralela y la neurona de Purkinje (Safo y Regehr, 2005) que es dependiente de la activación del receptor CB1, al menos en un estadio inicial (Safo y Regehr, 2005; Qiu y Knopfel, 2009; Carey *et al.*, 2011). Curiosamente se ha detectado la producción y liberación de óxido nítrico por parte de las fibras paralelas tras su estimulación, en la capa plexiforme de rodajas cerebelares (Shibuki y Kimura, 1997), si bien es cierto que en un estudio se constata la independencia del óxido nítrico en el mantenimiento de la LTD cerebelar inducida por endocannabinoides (Qiu y Knopfel, 2009). La aplicación de un antagonista del receptor CB1 una vez inducida la LTD no permite revertir esta inhibición (Chevalleyre y Castillo, 2003; Sjostrom *et al.*, 2003; Ronesi *et al.*, 2004), lo que hace pensar que una vez puesto en marcha el mecanismo efector no es necesaria la activación persistente del receptor (Heifets y Castillo, 2009). Debido a la dependencia de la inhibición de la adenilato ciclasa, los mecanismos moleculares que dan cuenta de la LTD han de estar relacionados con la disminución de los niveles de cAMP (Chevalleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008) y se postula que tengan efectos directos sobre proteínas de la maquinaria de liberación (Azad *et al.*, 2004; Heifets y Castillo, 2009; Tsetsenis *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2012). Tanto la proteína Rab3 como la proteína RIM son imprescindibles para los procesos de LTP presináptica dependientes de un incremento de los niveles de cAMP (Castillo *et al.*, 1997; Schoch *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005) y se ha observado que los procesos de LTD están facilitados en los ratones carentes de la proteína RIM (Schoch *et al.*, 2002). También se

ha demostrado que los procesos de LTD mediados por endocannabinoides son dependientes de la proteína RIM1 α y de la disminución de los niveles de cAMP (Chevalleyre *et al.*, 2007). En este contexto se había identificado a la fosforilación PKA-dependiente de la proteína RIM en su Serina 413 como la responsable de la potenciación a largo plazo (Lonart *et al.*, 2003; Kaeser y Sudhof, 2005). Sin embargo haciendo uso de un mutante de la proteína RIM1 α cuya Serina 413 se sustituye por una alanina (S413A), se ha demostrado recientemente que esta fosforilación es prescindible para los procesos de potenciación a largo plazo (Kaeser *et al.*, 2008), lo que descarta la idea de la fosforilación de la PKA sobre RIM1 como factor crítico en la mediación de procesos de LTP y LTD (Heifets y Castillo, 2009; Sudhof, 2012b). Cabe destacar que la interacción entre Rab3 y RIM parece ser de crucial importancia para los procesos de LTP y LTD (Castillo *et al.*, 1997; Schoch *et al.*, 2002; Tsetsenis *et al.*, 2011) y esta interacción es dependiente de que la proteína Rab3 esté unida a GTP, lo que supone un punto de regulación de esta interacción, ya que el estado de Rab3 (Rab3-GDP o Rab3-GTP) impide o permite, respectivamente, la interacción de Rab3 con RIM1 (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000). Aunque se considera la PKA como la mediadora canónica de los efectos del cAMP, existen múltiples dianas susceptibles de ser reguladas por las variaciones en los niveles de cAMP (Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003; Rehmann *et al.*, 2003; Seino y Shibasaki, 2005; Bos, 2006; Efetova *et al.*, 2012). Una de estas dianas es la proteína EPAC (del inglés *Exchange Protein directly Activated by CAMP*) (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; de Rooij *et al.*, 2000), un factor intercambiador de nucleótidos de guanina cuya acción canónica es ejercida sobre la proteína Rap1 (Kawasaki *et al.*, 1998). Existen dos isoformas de la proteína Epac codificadas por dos genes distintos *rapgef1* y *rapgef2*, que dan lugar a las proteínas EPAC1 y EPAC2 respectivamente (Kawasaki *et al.*, 1998; Ueno *et al.*, 2001). Ambas contienen cuatro

dominios funcionales: un dominio de unión a cAMP, un dominio DEP (Dishevelled, Egl-10, y Pleckstrin) responsable de su localización en membrana, un dominio REM (del inglés, *Ras Exchange Motif*) y el dominio GEF (del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) (Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003). La expresión de la isoforma EPAC1 es ubicua en el ratón adulto, pero los niveles de expresión son bajos en sistema nervioso central. En cambio los niveles de expresión de la isoforma EPAC2 son altos en distintas regiones del sistema nervioso adulto de ratón adulto (Kawasaki *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 2000). No sucede lo mismo en el sistema nervioso de rata, donde la expresión de ambas isoformas es elevada en distintas regiones encefálicas (Gekel y Neher, 2008). Se ha demostrado que la activación de las proteínas EPAC potencia la liberación de neurotransmisor en sinapsis hipocámpales (Gekel y Neher, 2008) y en sinapsis caliciformes de la vía auditiva (Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004), y se ha sugerido que estas acciones de potenciación son independientes de la modulación de canales iónicos y han de estar relacionadas con efectos sobre la maquinaria de liberación (Kaneko y Takahashi, 2004). En animales carentes de ambas isoformas de la proteína EPAC se ha demostrado una disminución de la liberación de neurotransmisor, tanto espontánea como inducida por estimulación, que conlleva una deficiencia de los procesos de LTP y de distintos tipos de aprendizaje, así como de las interacciones sociales de estos animales (Yang *et al.*, 2012). Además se ha demostrado que la señalización inhibitoria mediada por el receptor GABA B, que consiste en una disminución de los niveles de cAMP opera por medio de una disminución de actividad de la proteína EPAC2 (Sakaba y Neher, 2003). Se ha demostrado la existencia de un complejo proteico en el que la proteína EPAC2 interacciona con Rim1 y con Piccolo (Ozaki *et al.*, 2000; Kashima *et al.*, 2001; Fujimoto *et al.*, 2002), lo que posibilitaría la interacción de EPAC2 con Rab3, pudiendo modularse de esta manera el estado de

activación de Rab3 (Ozaki *et al.*, 2000; Seino y Shibasaki, 2005). Este hecho se ha demostrado en la reacción acrosómica del espermatozoide, donde la activación de EPAC promueve la exocitosis por inducir la unión de Rab3 a GTP (Branham *et al.*, 2009). El otro vínculo directo existente entre la activación de EPAC y la maquinaria exocitótica es la activación dependiente de EPAC de la fosfolipasa C- ϵ (PLC ϵ), que promueve la generación de DAG y podría dar lugar al reclutamiento de Munc13-1 a la membrana plasmática (Schmidt *et al.*, 2001). A lo largo del trabajo que aquí se presenta se ha estudiado la posible implicación de la proteína EPAC en algunas formas de depresión sináptica mediada por cannabinoides.

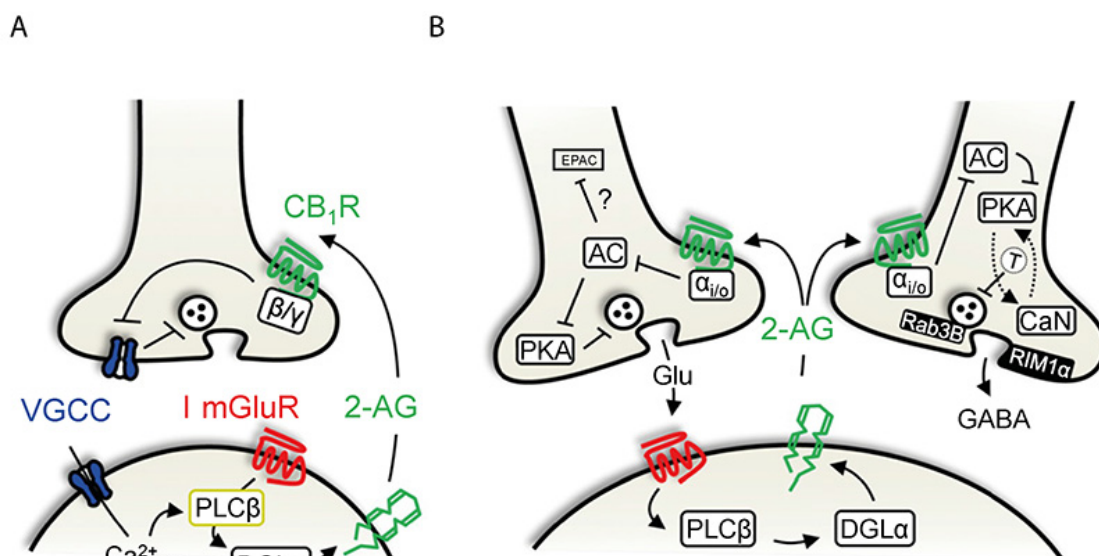


Figura 11- Síntesis y mecanismos de acción de los cannabinoides endógenos en DSI/DSE (A) y en LTD (B). Adaptado de (Castillo *et al.*, 2012)

4-Sinapsis silentes

De entre todas las formas conocidas de depresión sináptica, probablemente el silenciamiento constituye la forma más abrupta de todas. Una sinapsis silente se caracteriza por exhibir una ausencia total de exocitosis ante la llegada de un estímulo, a pesar de experimentar una entrada de calcio normal y contener una composición de proteínas similar a la de una sinapsis funcional (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010; Cousin y Evans, 2011; Crawford *et al.*, 2011). Es importante mencionar, que, debido a esta clasificación, una sinapsis silente podría ser confundida con una sinapsis con baja probabilidad de liberación si el estímulo aplicado es demasiado débil (Cousin y Evans, 2011), lo que podría hacer atribuir efectos activadores a cascadas de señalización que únicamente produzcan un incremento en la probabilidad de liberación. Los mecanismos que subyacen al silenciamiento sináptico son solo parcialmente conocidos. Parece ser que un defecto en el proceso de preparación de las vesículas sinápticas es responsable de este efecto (Moulder *et al.*, 2006), defecto que puede ser revertido mediante la aplicación de Forbol 12, 13 diButirato (PDBu) (Chang *et al.*, 2010) y mediante activadores de la ruta del cAMP como la forskolina, activador de la adenilato ciclasa (Chavis *et al.*, 1998; Kohara *et al.*, 2001; Moulder *et al.*, 2008; Cousin y Evans, 2011; Crawford *et al.*, 2012). Un reclutamiento masivo de vesículas hacia el "pool" de reserva podría desencadenar un comportamiento equivalente al de una sinapsis silente, ambos efectos podrían suceder de forma paralela (Kim y Ryan, 2010; Mitra *et al.*, 2012). También se ha descrito una activación rápida de sinapsis previamente silentes asociada a la polimerización de actina (Shen *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006). El papel fisiológico de las sinapsis silentes podría ser una adaptación a periodos de hiperactividad, hecho que concuerda con la aparición de este tipo de sinapsis tras periodos prolongados de despolarización (Moulder *et al.*,

2006). Sin embargo, se ha demostrado que la activación de distintos tipos de receptores metabotrópicos puede dar lugar a la aparición de estas sinapsis (Crawford *et al.*, 2011), lo que hace pensar que estas sinapsis puedan tener una relevancia fisiológica más allá de un mero papel neuroprotector (Mitra *et al.*, 2012). Es de particular importancia en este contexto el caso del cerebelo y en concreto la sinapsis entre la fibra paralela y la célula de Purkinje (Porrill y Dean, 2008; Dean *et al.*, 2010); de hecho, se ha demostrado en vivo que la mayoría de sinapsis (hasta un 85%) entre las fibras paralelas y las células de Purkinje son silentes (Isope y Barbour, 2002). En el caso del aprendizaje motor en el cerebelo, parece ser, debido al elevado número de contactos que se establecen entre una fibra paralela y una célula de Purkinje, que la mayoría de la información transmitida por las fibras paralelas es ruido (información fútil). Así, el aprendizaje motor parece consistir en un ajuste a la baja de esta sobrecarga de información, lo que conlleva un ajuste heterogéneo de los pesos sinápticos y en algunos casos lleva a silenciar algunas de estas conexiones (Porrill y Dean, 2008; Dean *et al.*, 2010) de forma concomitante a la potenciación de otras conexiones (Dean *et al.*, 2010). Esta redistribución heterogénea de pesos sinápticos parece tener lugar también en el área CA3 del hipocampo ante la adaptación de la red neuronal a la inactividad (Mitra *et al.*, 2012). Por otro lado, si se atiende a las dianas postsinápticas de las fibras paralelas, estas establecen sinapsis directamente sobre las células de Purkinje, e indirectamente, por medio de interneuronas inhibitorias. Dado que esto tiene efectos opuestos sobre la célula de Purkinje, es concebible que en el momento de potenciarse una interacción directa sobre la célula de Purkinje, se deprima la interacción indirecta por medio de la interneurona inhibitoria, lo que acarrearía una redistribución heterogénea de los distintos pesos sinápticos de una misma fibra paralela (Dean *et al.*, 2010). En el presente trabajo se han estudiado los

mecanismos moleculares que subyacen a la inducción de silenciamiento en una subpoblación de sinapsis tras una activación persistente del receptor CB1.

II- Objetivos

"Cuando emprendas tu viaje a Ítaca, pide que el camino sea largo, lleno de aventuras y experiencias. No temas a los lestrigones, ni a los cíclopes, ni al colérico Poseidón..."

C. Kavafis

II-Objetivos

A lo largo de este trabajo hemos estudiado, mediante dos paradigmas distintos, aspectos funcionales relacionados con el ciclo vesicular sináptico en neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo. En un primer lugar se analizaron aspectos de la endocitosis sináptica que parecían estar regulados durante la maduración de estas neuronas. Por otro lado hemos estudiado un modelo de plasticidad relacionado con aspectos excitotóxicos del ciclo vesicular en el que se disecaron farmacológicamente los mecanismos moleculares subyacentes a la plasticidad mediada por cannabinoides. Los objetivos concretos son los que se plantean a continuación:

1-Endocitosis

1.1- Estudiar la eficacia de reciclamiento de vesículas sinápticas en neuronas granulares de cerebelo en cultivo de forma paralela a la maduración de dichas neuronas.

1.2- Corroborar, mediante diferentes técnicas, la coexistencia de distintas rutas de endocitosis en sinapsis individuales en determinados momentos del desarrollo de las neuronas granulares, así como indagar cuáles son los determinantes moleculares responsables de la puesta en marcha de uno u otro tipo de endocitosis.

1.3- Investigar la composición proteica de sinapsis individuales tratando de relacionar el contenido sináptico de determinadas proteínas con la eficacia de reciclamiento.

2-Exocitosis

2.1- Caracterización y estudio de los mecanismos subyacentes a la inhibición presináptica mediada por cannabinoides en fibras paralelas de neuronas granulares en cultivo.

2.2- Evidenciar la inducción de silenciamiento sináptico tras un tratamiento prolongado con el agonista del receptor CB1.

2.3- Estudiar posibles efectos ultraestructurales en el terminal presináptico asociados con la inhibición mediada por cannabinoides.

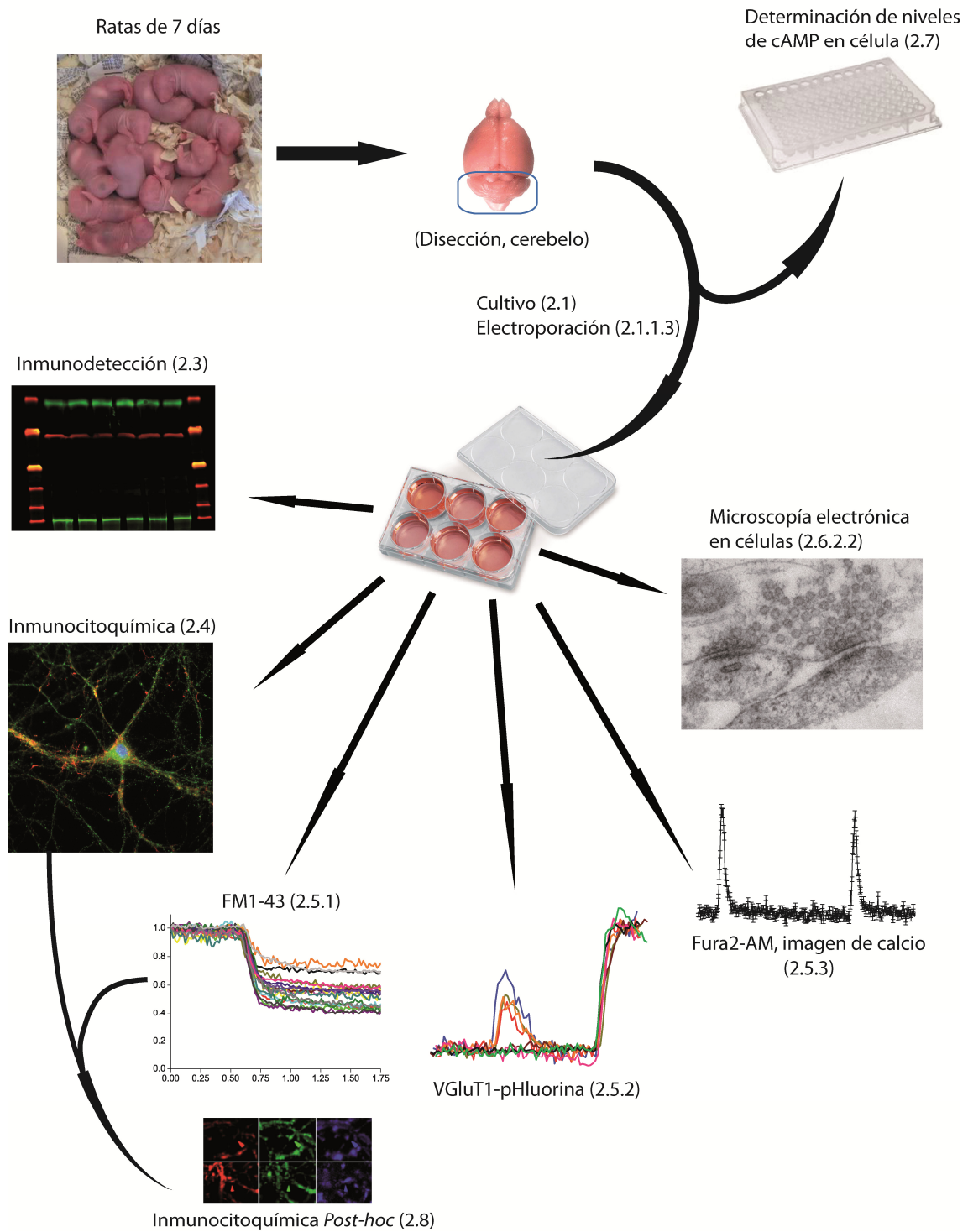
2.4- Analizar la independencia de PKA de algunas de las formas de depresión sináptica relacionadas con la disminución de los niveles de cAMP tras la estimulación del receptor CB1.

2.5- Estudiar la heterogeneidad, dentro de una población de sinapsis, en lo que a la susceptibilidad de la inhibición por cannabinoides se refiere, tratando de correlacionar estas diferencias con la composición de proteínas de sinapsis individuales. Las proteínas que aquí se analizaron fueron el receptor CB1 y distintas proteínas de zona activa.

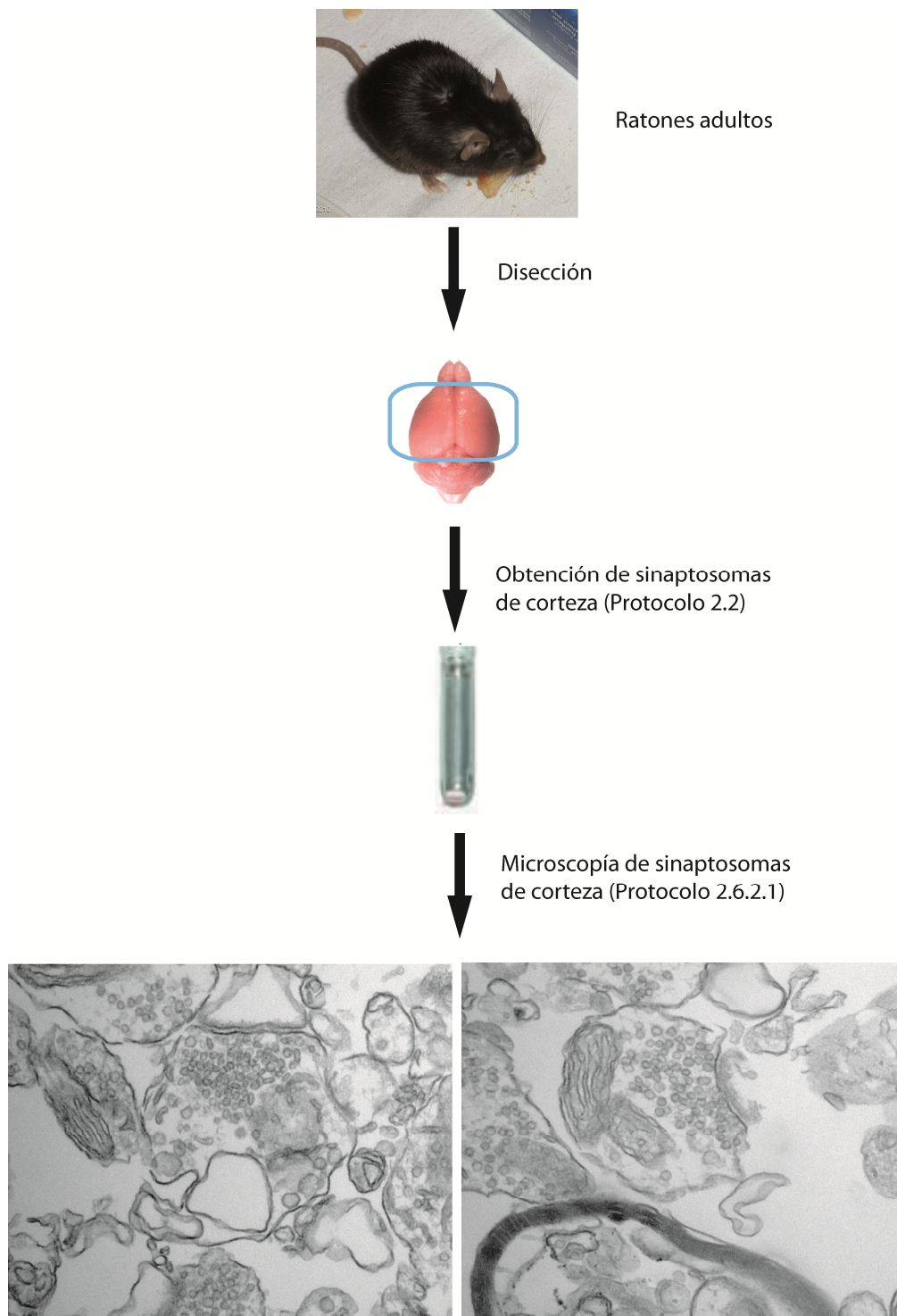
III- Material y métodos

"Aquel que tiene un porqué para vivir, se puede enfrentar a
todos los cómo"

F. Nietzsche



I) Resumen gráfico de la metodología empleada para los experimentos con neuronas granulares de cerebelo de rata, el número entre paréntesis indica el apartado en que se describe el protocolo llevado a cabo en cada caso.



II) Resumen gráfico de la metodología empleada para los experimentos con sinaptosomas de corteza cerebral de ratón, el número entre paréntesis indica el apartado en que se describe el protocolo llevado a cabo en cada caso.

II-Materiales y métodos

1-Materiales

1.1-Material biológico

Para la realización de los cultivos celulares y de los experimentos que de estos se derivan, se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 7 días postnatales. La privación maternal se llevó a cabo 1 hora antes del sacrificio, por ser este el tiempo requerido para el transporte de los animales desde el animalario de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para algunos de los estudios ultraestructurales se emplearon ratones (*Mus musculus*) CB57/BL6 bien de genotipo silvestre (Wt, del inglés *wild type*) o bien carentes del gen que codifica para el receptor de cannabinoides CB1 (*cnr1*^{-/-}). Estos animales fueron cedidos conjuntamente por los doctores Beat Lutz (Universidad de Mainz) e Ismael Galve-Roperh (Universidad Complutense de Madrid)

El manejo de todos los animales empleados en la realización de este trabajo de investigación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones éticas para la experimentación con animales y las regulaciones establecidas por la directiva del consejo europeo (86/609/EEC) aprobadas por el comité ético de la UCM.

1.2-Equipos

1.2.1-Electroporación y cultivos

Para aquellos experimentos en los que se requirió transfectar las neuronas con material genético exógeno se utilizó el equipo Amaxa Nucleofector II de Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania).

Para los cultivos celulares se hizo uso de un agitador orbital modelo WY-100 de la marca COMECTA (Barcelona, España), una cabina de flujo PV-30 de Telstar (Terrassa, España) y un incubador HERAccl® de Thermo Fisher Scientific (NC, EE.UU.).

1.2.2-Adquisición de imagen: Microscopios y cámaras

El microscopio empleado tanto para la realización de los experimentos en célula viva como para la adquisición de imágenes de inmunofluorescencia fue un microscopio de la marca Nikon (Japón) modelo Eclipse TE-2000S equipado con un objetivo inmersión en aceite Nikon CFI plan Apo VC 60x con una apertura numérica de 1.4 y una cámara CCD modelo iXon^{EM}+DU885 de Andor Technology (Belfast, Irlanda). Los fluoróforos fueron excitados con un monocromador de la marca Kinetic Imaging (Nottingham, Reino Unido) a las longitudes de onda requeridas. Para la adquisición de imágenes de microscopía electrónica se empleó el microscopio JEM1010 de la marca JEOL (Tokyo, Japón) del Centro Nacional de Microscopía Electrónica. Para los experimentos de microscopía en célula viva se utilizó una cámara de perfusión modelo PH5, la perfusión se llevó a cabo con un sistema VC6 y la temperatura se mantuvo a 37°C haciendo uso de un termostato TC-344B, todos ellos de Warner Instruments (CT, EE. UU.)

1.2.3-Detección de proteínas

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida y la posterior transferencia de proteínas a membranas se empleó el dispositivo Mini-Protean® Tetra Cell de Bio-Rad (CA, EE. UU.). En la detección de proteínas transferidas a membranas se empleó el sistema Odyssey de Li-Cor Biosciences (NE, EE.UU.).

1.2.4-Acumulación de cAMP

Para la determinación de los niveles de AMP cíclico se empleó un lector de placas FLUOStar Omega de la marca BMG LabTech (Ortenberg, Alemania).

1.3-Reactivos, anticuerpos y fármacos

Se indicarán las casas comerciales y posteriormente el material adquirido en cada una de ellas.

1.3.1-Material de cultivos

Worthington (NJ, EE. UU.): Kit de digestión enzimática con papaína para la disociación del tejido nervioso (nº cat.: LK003160).

Invitrogen™, Life Technologies™ (CA, EE.UU.): Medio de cultivo Neurobasal A (nº cat.:10888-022); suplemento de medio de cultivo B-27 (nº cat.: 17504044); fuente de glutamina de degradación lenta Glutamax (nº cat.: 35050038).

Lonza (Basilea, Suiza): Rat Neuron Nucleofector ® Kit, kit para la electroporación de neuronas de rata, composición desconocida (nº cat.: VPG-1003)

Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.): Citosina β -D-arabinofuranosido, inhibidor de la replicación del DNA (nº cat.: C1768); solución antibiótica y antimicótica (nº cat.: A5955) y EBSS (del inglés *Earle's Balanced Salt Solution*; nº cat.: E6267).

Biochrom AG (Berlín, Alemania): Poli-L-Lisina como sustrato adherente para las células (nº cat.: L 7240).

1.3.2-Acumulación de cAMP

CisBio (Codolet, Francia): Kit *dynamic 2* de medida de acumulación de cAMP (nº cat.: 62AM4PEB)

Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.): IBMX (3-Isobutil-1-Metilxantina), inhibidor de las fosfodiesterasas de cAMP y cGMP (nº cat.: I5879)

1.3.3-Microscopía electrónica

Electron Microscopy Sciences (PA, EE. UU.): Tetróxido de osmio (OsO_4), fijador de microscopía electrónica (nº cat.: 19170).

Merck (MA, EE.UU.): Óxido de propileno empleado para despegar la monocapa de células de la placa de cultivo (nº cat.: 818567); Ferricianuro potásico (nº cat.: 104971).

Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.): Glutaraldehído grado I para microscopía electrónica (nº cat.: G5882)

TAAB (Berkshire, Reino Unido): Kit de resinas SPURR® para la inclusión de las muestras de microscopía electrónica (nº cat.: S024D)

1.3.4-Inmunodetección

1.3.4.1-Anticuerpos primarios

Applied Biosystems (CA, EE.UU.): Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**GAPDH** (Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa) (nº cat.: AM4300)

BD Transduction laboratories (NJ, EE.UU.): Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**Calcineurina** (nº cat.: 610259)

Frontier Institute Co. Ltd (Hokkaido, Japón): Anticuerpo policlonal de cobaya anti-**CB1R** (receptor de cannabinoides de tipo I) (nº cat.: CB1-GP-Af530)

Millipore (MA, EE.UU.): Anticuerpo policlonal de ratón anti-**fosfo-Sinapsina I** (nº cat.: 07-567); Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**GluA3** (nº cat.: MAB5416)

Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.): Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**β-Tubulina** (nº cat.: T0198).

Synaptic Systems (Goettingen, Alemania): Anticuerpo policlonal de cobaya anti-**Bassoon** (cat. nº: 141004); Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**Munc13-1** (nº cat: 126111); Anticuerpo policlonal de conejo anti-**Dinamina** (nº cat: 115002); Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**Sinapsina I** (nº cat: 106001); Anticuerpo policlonal de conejo anti-**VGluT1** (nº cat.: 135302); Anticuerpo policlonal de conejo anti-**Sinaptojanina I** (nº cat.: 145003); Anticuerpo monoclonal de ratón anti-**Syntaxina I** (nº cat.: 110001); Anticuerpo policlonal de conejo anti-**Sinaptofisina I** (nº cat.: 101002)

1.3.4.2-Anticuerpos secundarios, líquido de montaje, sueros, cubreobjetos y portaobjetos

Jackson ImmunoResearch (PA, EE. UU.): Sueros normales de cabra (nº cat.: 005-000-121) y de burro (nº cat.: 017-000-121).

Li-Cor Biosciences (NE, EE. UU.): Anticuerpos marcados con fluoróforos excitables en el infrarrojo para la detección de proteínas en *western blot*. Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón IRDye 680 (nº cat.: 926-32220); Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón IRDye 800 CW (nº cat.: 926-322110); Anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo IRDye 800 CW (nº cat.: 926-32211).

Mentzel-Gläser (Braunschweig, Alemania): Cubreobjetos circulares de vidrio de 15 mm de diámetro (nº cat.: CB00150RA1) y portaobjetos de vidrio de 26 x 76 mm (nº cat.: AD00000112E).

Molecular Probes™ Life Technologies™ (CA, EE. UU.): Anticuerpos marcados con fluoróforos Alexa para su detección inmunocitoquímica. Anticuerpo de cabra anti-cobaya marcado con Alexa 546 (nº cat.: A11074); Anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Alexa 594 (nº cat.: A11005); Anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Alexa 488 (nº cat.: A11001); Anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con Alexa 488 (nº cat.: A11008). Líquido de montaje ProLong Antifade con DAPI, (4',6-DiAmidino-2-FenilIndol) para el marcaje de núcleos celulares (nº cat.: P36935).

1.3.5-Extracción de proteínas, electroforesis y transferencia de proteínas a membrana

Bio-Rad (CA, EE. UU.): solución de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 40% (nº cat.: 161-0148), Dodecil Sulfato Sódico, SDS purificado (nº cat.: 161-0301), TEMED (nº

cat.: 161-0800), persulfato de amonio (APS) (nº cat.: 161-0700), Tris base purificado (161-0716), membranas de nitrocelulosa (nº cat.: 162-0115), β -mercaptoetanol (nº cat.: 161-0710), glicina (nº cat.: 161-0718), patrones de peso molecular (rango 10-250 kDa; nº cat.: 161-0373) y el reactivo de Bradford para la determinación de proteínas (nº cat.: 500-0205).

Li-Cor Bioscience (NE, EE. UU.): Odyssey blocking buffer (nº cat.: 927-40000)

Thermo-Fischer Scientific NC, EE. UU.): Tampón RIPA para extractos de proteínas totales (nº cat.: 11834141); Kit de inhibidores de proteasas y fosfatasa (nº cat.: 10085973).

1.3.6-Experimentos de imagen en célula viva, sales sondas y fármacos

1.3.6.1-Sales

Todas las sales se adquirieron a Merck-Millipore. No se indican números de referencia.

1.3.6.2-Fármacos

Alomone labs: Tetrodotoxina, TTX, bloqueante de canales de sodio dependientes de voltaje (nº cat.: T-550).

ASCENT scientific (Cambridge, Reino Unido): Bromuro de tetradeciltrimetilamonio, MiTMAB®; impide el reclutamiento de la dinamina a membranas (nº cat.: Asc-473); Bafilomicina A1, inhibidor de las V-ATPasas (nº cat.: Asc-497).

Calbiochem (CA, EE. UU.): Forskolina (nº cat.: 344270); H-89, inhibidor de la PKA (nº cat.: 371962); T0070907, Antagonista del receptor PPAR γ (nº cat.: 575305).

Chaiman Chemical (MI, EE. UU.): Daidzeina, isoflavonoide vegetal con efecto estrogénico (nº cat.:10005166).

BioLog (Bremen, Alemania): 8-p-Cpt-2'-Me-O-cAMP, activador de la proteína EPAC (nº cat.: C041); N⁶-Bnz-cAMP, activador de la PKA (nº cat.: B-009).

Bio-Rad (CA, EE. UU.): Azul de Bromofenol (nº cat.:161-0404).

Merck (MA, EE.UU.): Toxina pertúsica (PTX) (nº cat.:516560); SQ-22536, Inhibidor de la adenilato ciclasa (nº cat.: 568500).

Sanofi (Paris, Francia): SR141716, agonista inverso/antagonista del receptor CB1 (cedido, no disponible).

Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.): Dynasore; inhibidor de la actividad catalítica de la dinamina (nº cat.: D7693); 4- β -forbol-12, 13-dibutirato, PDBu (nº cat.: P1269).

Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido): HU-210, potente agonista cannabinoide (nº cat.: 0966).

1.3.6.3-Sondas

Molecular Probes™ Life Technologies™ (CA, EE. UU.):

-FM1-43: sonda anfipática, con estructura similar a un fosfolípido, que se internaliza en el lumen de las vesículas sinápticas tras un ciclo de exo/endocitosis y rinde fluorescencia en entornos hidrofóbicos (tras su partición en membrana). Se usa como trazador del ciclo vesicular sináptico (nº cat.: T35356).

Fura2-AM: Indicador ratiométrico de la concentración intracelular de calcio. Una vez hidrolizado por la esterasas intracelulares es capaz de unir calcio, lo que provoca variaciones en su espectro absorción. Mediante el cálculo del cociente de los valores de emisión tras su excitación dual a 340 y 380 nm (relación 340/380), se pueden inferir las variaciones en la concentración intracelular de calcio (nº cat.: F-1221).

2-Métodos

2.1-Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata y electroporación

Como se comentó en la introducción, los experimentos descritos en este trabajo han sido enfocados a la caracterización de fenómenos de plasticidad y maduración del

elemento presináptico de lo que, *in vivo*, constituye la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. Como modelo de estudio de estos fenómenos se emplearon cultivos de neuronas granulares de cerebelo obtenidas de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de siete días postnatales. Ha de destacarse que, a diferencia de otros tipos de neuronas, los cultivos de cerebelo se pueden obtener a partir de postnatales tardíos por estar dilatada la ventana proliferativa de estas células hasta dichos estadios en el animal.

2.1.1-Protocolo

2.1.1.1-Preparación de los cubreobjetos

Para favorecer la formación de la matriz de poli-L-Lisina sobre la superficie del cristal se procedió como se describe a continuación:

- 1-Sumergir los cubreobjetos en HCl 1,5M durante 20 minutos en una placa Petri.
- 2-Lavar con abundante agua estéril (x3).
- 3-Dejar secar y extender 100µl de Poli-L-Lisina 0,1 mg/ml sobre cada cubreobjetos. Mantener un mínimo de 3 horas a 37°C.
- 4-Lavar con agua estéril (x3).
- 5-Colocar en las placas de cultivo y dejar secar.

En las placas de cultivo de 6 pocillos se procedió de igual forma pero a partir del paso 3, cubriendo completamente el fondo del pocillo con la Poli-L-Lisina 0,1 mg/ml.

2.1.1.2-Realización del cultivo

1-Sacrificio de los animales por decapitación, extracción del cerebelo y limpieza de las meninges y elementos vasculares en una placa Petri con EBSS frío, una vez limpios los cerebelos se transfieren a otra placa Petri con EBSS limpio y frío.

2-Disección mecánica el tejido con tijeras de cirugía de punta curva.

3-Transferencia de los cerebelos triturados a un tubo de 50 ml con EBSS conteniendo: 12,5 U/ml de papaína; 600U de DNAasa I; 2mM CaCl_2 y 2mM MgCl_2 . Incubar en agitación (250 rpm.) a 37° C durante una hora. La incubación a 37°C favorece la disgregación enzimática del tejido.

4-Disgregación de los restos no digeridos mediante aspiración y expulsión enérgica con una pipeta automática de 10 ml. Es importante evitar la formación de burbujas

5-Centrifugación a 110g (1.000 rpm en una centrífuga de 9,8 cm de radio), durante 5 minutos.

6-Descartar el sobrenadante; añadir al precipitado medio EBSS con ovomucoide (1 mg/ml) y resuspender.

7-Añadir la suspensión de células a una disolución de ovomucoide de 10mg/ml contenida en un tubo de 15ml. Agitar antes de añadir las células.

8-Centrifugar la solución de ovomucoide a 110g durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante comenzando por la parte superior del tubo en la que se suele formar espuma.

9-Resuspender el precipitado de células en 3ml de Neurobasal A.

10-Preparar una dilución 1:10 de la solución de células obtenida en el paso 9.

11-Preparar una dilución 1:1 con azul tripán de la dilución obtenida en el paso 10 y contar en cámara Neubauer. La densidad celular, en cel. /ml viene dada por la siguiente igualdad:

$$\text{Cel. /ml} = \text{N}^{\circ} \text{ cel. contadas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

Donde:

Factor de dilución=20 (1/10 en el paso 9; 1/2 en el paso 10)

10^4 = Viene de dividir el número de contado células entre el volumen de cada recuadro que es de 10^{-4} ml.

12-Siembra de las células a las siguientes densidades, en medio Neurobasal A suplementado con B-27 (1x) y solución antibiótica antimicótica (1x), conteniendo una concentración final de KCl de 25mM:

- 10^6 células por pocillo para las placas de 6 pocillos (inmunodetección en membranas y microscopía electrónica).
- $1-3 \times 10^5$ células por cubreobjetos de 15mm de diámetro.
- 10^5 células por pocillo en las placas de 96 pocillos.

13-Reemplazar el medio tras 24 horas con medio fresco (paso 12) y citosina arabinósido a una concentración final de $10\mu\text{M}$, lo que inhibirá la proliferación glial. Los cultivos de Neuronas granulares son viables hasta más de 14 DIV, realizándose la mayoría de experimentos alrededor de 7DIV, por ser este el momento del pico sinaptogénico en nuestros cultivos.

2.1.1.3-Electroporación

Cuando se requirió las células se electroporaron a 0 DIV. El plásmido electroporado codifica para una versión del transportador vesicular de glutamato que contiene una GFP modificada entre los segmentos transmembrana 1 y 2 de dicha proteína, esto permite monitorizar los eventos exo/endocitóticos al registrar los cambios en la fluorescencia de la GFP que acontecen de forma paralela al ciclo vesicular, por variaciones del pH del interior de la vesícula sináptica. Se le denominará plásmido VGluT1-pHluorina.

1-Pipetear, en tubos eppendorf de 1,5 ml un volumen conteniendo $4-5 \times 10^6$ células por electroporación a realizar, a partir de la suspensión de células del paso 9 del apartado anterior.

2- Centrifugar 2 minutos a 245g (2.000 rpm en una microfuga de radio 5,5 cm) y descartar el sobrenadante.

3-Resuspender el precipitado en 100 μ l de Rat Neuron Nucleofector [®] Solution y añadir 1 μ g de plásmido VGluT1-pHluorina (se representa el plásmido en la figura 1). Esperar 10 minutos.

4- Pipetear el contenido en una cubeta de electroporación estéril y electroporar. Se utilizó el programa O-003, por lo descrito en (Lopez-Jimenez *et al.*, 2009).

5-Pipetear sobre estos 100 μ l, 500 μ l más de medio Neurobasal con B-27 previamente atemperado (37°C) y transferir a un eppendorf estéril. Mantener 20 minutos en el incubador de células.

6- Sembrar a una densidad final de $1-2 \times 10^6$ células por cubreobjetos. Es conveniente sembrar la muestra obtenida en el paso 5 sobre 1 ml de medio Neurobasal A con B-27 previamente atemperado.

7-Añadir, tras 2 horas en el incubador, 1,5 ml más de medio Neurobasal A con B-27. No añadir citosina arabinósido.

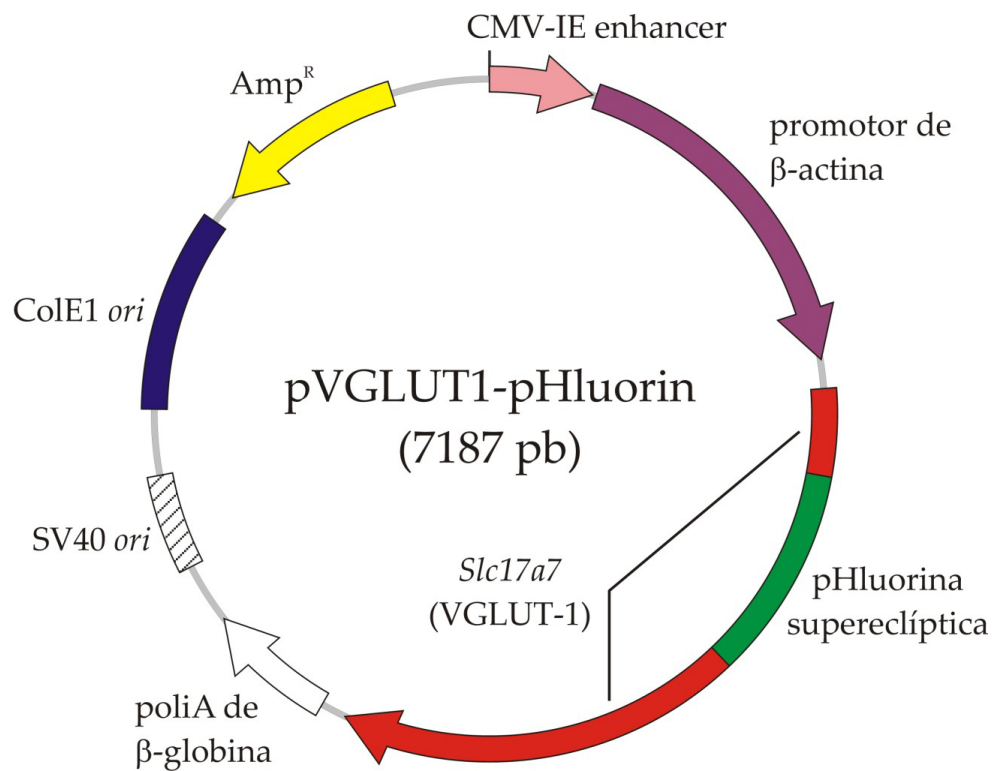


Figura 1- Plásmido empleado para electroporar a 0DIV las neuronas granulares de cerebelo con la construcción VGLUT1-pHluorina.

2.2-Obtención de sinaptosomas

Para el aislamiento de terminales presinápticos autónomos en términos energéticos y con funcionalidad exocitótica se procedió de forma acorde al método descrito por Dunkley y colaboradores (Dunkley *et al.*, 1986).

1-Sacrificio por dislocación cervical y posterior decapitación.

2-Extracción del cerebro y disección de las cortezas cerebrales.

3-Homogeneizado de las cortezas en sacarosa 0,32 M (pH=7,4; 4°C) con un homogeneizador con vástago de teflón (realizar hasta 7 pases a 700 rpm).

4-Centrifugar a 2.000 g durante 2 minutos a 4°C y descartar el precipitado (P1). Aislar el sobrenadante (S1).

5- Volver a centrifugar el S1 a 9.500g durante 12 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante (S2) y conservar el precipitado (P2). Resuspender este precipitado en sacarosa 0,32M.

6-Centrifugar el P2 resuspendido sobre un gradiente de Percoll constituido por tres bandas de Percoll al 3%, 10% y 23% a 25.000g durante 10' a 4°C.

7-Recoger, por aspiración suave la interfase depositada entre las bandas de 23% y 10%.

Resuspender en HBM (*Hepes Buffer Medium*: NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

8-Centrifugar a 22.000g durante 10 minutos y descartar el sobrenadante (S3).

Resuspender el precipitado (P3) en HBM fresco y cuantificar proteínas mediante el método de Biuret. Hacer alícuotas de 0,75 mg de proteínas totales.

9-Centrifugar a 3.000g durante 10 minutos y descartar el sobrenadante. El precipitado se almacena a 4°C (en hielo) y los terminales presinápticos son funcionales entre 4-6h después de su obtención.

2.3-Extracción de proteínas e inmunodetección en membranas

Para la cuantificación de proteínas sinápticas se empleó la técnica de *western blot* e inmunodetección en membrana como se describe a continuación.

2.3.1-Extracción de proteínas totales

1-Lavar dos veces cada pocillo de la placa ($3,5 \times 10^6$ células por pocillo) con PBS 1x (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na_2HPO_4 ; 18mM KH_2PO_4 , pH=7,4) atemperado a 37°C.

2-Añadir un volumen de tampón RIPA (200-300 μl por pocillo) suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas (1x), rascar el fondo del pocillo enérgicamente y mantener 15 minutos a 4°C.

3- Recoger el contenido de los pocillos en tubos eppendorf y centrifugar a 10.400g (13.000 rpm en microfuga de $r=5,5$ cm) durante 15 minutos. Descartar el precipitado y guardar el sobrenadante.

4- Cuantificación de la concentración de proteínas mediante método colorimétrico de Bradford.

2.3.2-Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y transferencia a membranas

1- Preparación de los geles. *Gel concentrador*: 4% Acrilamida; 125mM Tris; 0,1% SDS (p/v); 0,05% Persulfato amónico (p/v) en un volumen final de 10ml. Añadir 12 µl de TEMED como catalizador de la reacción de polimerización. Añadir justo antes de servir el gel. *Gel separador*: 8% Acrilamida; 375mM Tris; 0,1 % SDS (p/v); 0,05% Persulfato amónico (p/v) en un volumen final de 12ml. Añadir 6 µl de TEMED como propagador de la reacción de polimerización justo antes de servir el gel.

2- Añadir a las muestras obtenidas en el paso tres del apartado anterior tampón de carga 5x (10% SDS (p/v); 50% Glicerol (v/v); 312mM Tris; 0,01% Azul de Bromofenol (p/v); 25% β-Mercaptoetanol (v/v)) hasta generar una dilución 1x del tampón de carga con los microgramos deseados de proteína a cargar (5-20 µg de proteínas totales, en función de la abundancia de la proteína de interés).

3-Cuando fue requerido, las proteínas se sometieron a desnaturalización térmica por tratamiento con calor (90°C, 10 minutos).

4-Cargar las muestras en los pocillos y correr la electroforesis a 4°C a amperaje constante (20 mA/gel) en tampón de electroforesis (25mM Tris; 192mM Glicina; 0.1% SDS; pH=8,3, no ajustar, comprobar) durante 1 hora 30 minutos. Añadir patrón de peso molecular en algún/os pocillo/s.

5-Unos minutos antes de detener la electroforesis, hidratar las membranas de nitrocelulosa con agua ultrapura y posteriormente equilibrar en tampón de transferencia (25mM Tris; 192mM Glicina; 20% Metanol (v/v); pH=8,3).

6-Una vez finalizado el proceso electroforético, equilibrar los geles en tampón de transferencia. La transferencia de proteínas se llevó a cabo a un amperaje constante de 250 mA durante 1 hora a 4°C en tampón de transferencia (25mM Tris; 192mM Glicina; 20% Metanol (v/v); pH=8,3).

7-Enjuagar las membranas en PBS para retirar el exceso de metanol. Bloquear en *Odyssey Blocking Buffer* durante 1 hora a temperatura ambiente. Es importante cerciorarse de que la solución de bloqueo cubre toda la membrana.

8-Incubar con los anticuerpos primarios a la concentración deseada, los anticuerpos primarios se diluyen en una solución 1:1 de *Odyssey Blocking Buffer* y PBS 1x (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄, pH=7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente u o/n a 4°C. Añadir Tween-20 a una concentración de 0,1% (v/v) disminuye la unión inespecífica de los anticuerpos (a continuación se indican las concentraciones de los anticuerpos empleados en este estudio para inmunodetección en membrana: Dinamina 1:1000; Syntaxina 1:1000; Sinaptojanina 1:200; β -Tubulina 1:2000; GAPDH 1:1000; CB1R 1:300; RIM1 α 1:400; Munc13-1 1:1000).

9-Lavar las membranas durante 5 minutos con PBS-Tween 20 al 0,1% (x4).

10-Incubar con los anticuerpos secundarios marcados para la lectura en el infra-rojo. Incubar en PBS 0,1 % Tween-20 (v/v), 0,01% SDS (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos secundarios se usaron a la concentración 1:15000.

11-Lavar la membrana con PBS Tween-20 al 0,1 % (x4).

12-Lavar una vez la membrana en PBS.

13-Dejar secar y escanear en Odyssey. El programa genera archivos tipo *.TIFF y los datos se pueden procesar haciendo uso del programa provisto con el equipo.

2.4 Inmunocitoquímica

Se emplearon para la detección inmunocitoquímica, cubreobjetos de 15mm de diámetro sembrados a una densidad de $1-3 \times 10^5$ cel. /cubreobjetos.

1-Lavar 5 minutos con PBS 1x (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na_2HPO_4 ; 18mM KH_2PO_4 , pH=7,4) a 37°C (x2).

2-Fijar con Paraformaldehído al 4% en PBS (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3-Lavar con PBS frío (x2).

4- Permeabilizar con PBS-Triton X-100 al 0,2% (v/v) a temperatura ambiente durante 6 minutos.

5-Bloquear durante 1 hora a 37°C en una solución de PBS 0,05% Tritón X-100 (v/v); 10% (v/v) suero de cabra.

6- Incubar o/n a 4°C con los anticuerpos primarios a la concentración deseada. Las empleadas en este estudio se indican a continuación: anti-Bassoon 1:500; anti-fosfo-Sinapsina 1:400; anti-Munc13-1 1:1000; anti-Calcineurina 1:50; anti-GluA3 1:200; anti-Dinamina 1:400; anti-Sinapsina 1:250; anti-VGluT1 1:200; anti-RIM1 α 1:400; anti CB1R 1:300. Los anticuerpos se incubaron en PBS 0,05% Triton X-100 (v/v), 5% Suero de cabra (v/v).

7-Lavar en PBS, 5 minutos (x3).

8-Incubar con el anticuerpo secundario 1h a 37°C en PBS (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄, pH=7,4). Todos los anticuerpos secundarios, marcados con fluoróforos Alexa, se emplearon a 1:200 en este estudio.

9- Lavar con PBS (x3). Tras el lavado, enjuagar los cubreobjetos en agua ultrapura para eliminar el exceso de sales.

10-Montar con líquido de montaje ProLong con DAPI sobre portaobjetos rectangulares. Cerciorarse de que no se forman burbujas durante el montaje.

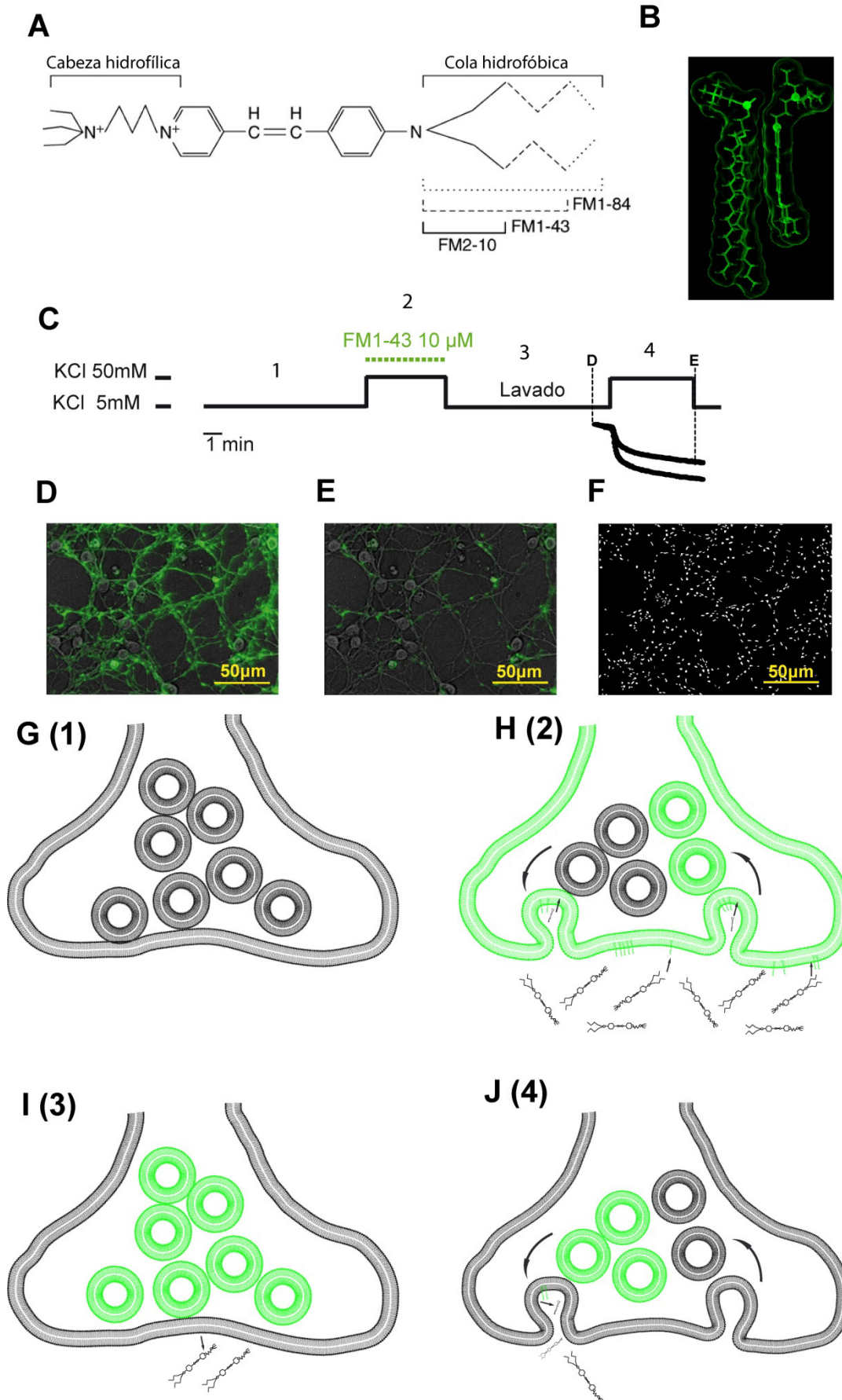
2.5 Imagen en célula viva

Para la monitorización del ciclo vesicular se emplearon dos estrategias, la sonda FM1-43 y la VGluT1-pHluorina.

2.5.1-FM1-43

Las sondas de tipo FM son derivados del estireno. Son moléculas anfipáticas, ya que cuentan con una cabeza polar con dos nitrógenos cuaternarios (que le impiden voltearse en la membrana) y una cola hidrofóbica hidrocarbonada, lo que le permite la partición en las membranas biológicas. La partición en membranas de estas moléculas es reversible, y la velocidad de partición viene determinada por la longitud de la cola hidrocarbonada. Una propiedad de las sondas FM es que no poseen fluorescencia en disolución acuosa, pero sí en entorno hidrofóbico, lo que las hace excelentes trazadores de la dinámica de las membranas biológicas (Cousin, 2008).

→ **Figura 2-** Estructura química (A) y molecular (B) de la sonda FM1-43. En C se muestra el protocolo experimental genérico de incorporación de la sonda en el interior de las vesículas sinápticas. D) Aspecto de un campo de neuronas posterior a la incorporación de sonda y previo a la estimulación durante el experimento; en E se muestra el aspecto del campo tras la realización del experimento. F) Regiones sinápticas a estudiar, la obtención de esta imagen se detalla en el apartado 3.2 de métodos. Las neuronas en reposo (G) son estimuladas en presencia de FM1-43 10 μ M (H), que se incorpora al lumen de las vesículas. Tras un periodo de lavado (I) se elimina el exceso de sonda unido a la membrana externa. La estimulación (J) genera una extinción de la fluorescencia por partición de la sonda en el medio extracelular. Los números corresponden a los números sobre el esquema en C.



En el trabajo aquí descrito se ha empleado la sonda FM1-43 con longitudes de onda de excitación comprendidas entre 480 y 490 nm y emisión a más de 510 nm, se trabajó con un filtro de Fluoresceína IsoTioCianato (FITC) que recoge longitudes de onda entre 520 y 540 nm (fluorescencia verde). La puesta en contacto de una monocapa de células con la sonda FM1-43 genera la partición de la misma en la membrana celular, generando un marcaje fluorescente uniforme en toda la célula. Al estimular neuronas en presencia de la sonda FM1-43 (por ejemplo, con KCl 50mM), la endocitosis compensatoria de las vesículas sinápticas atraparán moléculas de FM1-43 en el lumen vesicular y en principio, en las membranas externas (siempre en la hemicapa correspondiente a la cara E). Tras un periodo de lavado, solo aquellas moléculas de FM1-43 intercaladas en la hemicapa luminal de la membrana de las vesículas sinápticas serán responsables de la fluorescencia observada, lo que genera un aspecto punteado de la fluorescencia. Si tras un periodo de reposo, volvemos a estimular estas neuronas, se observará una extinción de la fluorescencia relacionada con la fusión con la membrana presináptica de aquellas vesículas que habían retenido FM1-43, lo que provoca la partición de esta en el medio extracelular. Posteriormente, gracias al procesamiento informático de las imágenes, podemos analizar exclusivamente aquellas regiones en las que el apagamiento de fluorescencia durante la segunda estimulación sea compatible con el de una región sináptica (ver apartado 3.2). La ventaja de esta técnica reside en la capacidad de poder analizar el comportamiento de sinapsis individuales; puesto que en un único experimento se pueden registrar hasta varios miles de respuestas aisladas, el poder analítico, en términos estadísticos, de este tipo de experimentos, es bastante elevado. Los tratamientos se llevaron a cabo en función del fenómeno a analizar, si se pretendían estudiar aspectos endocitóticos del ciclo vesicular, se llevó a cabo una incubación previa

a la incorporación de la sonda en el lumen de las vesículas, en cambio, si el objetivo era estudiar fenómenos exocitóticos, el tratamiento fue posterior a la carga con la sonda.

2.5.1.1-Tampones

HBM de reposo: (del inglés *Hepes Buffer Medium* NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

HBM de estimulación (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH=7,4).

HBM de reposo-BPB: HBM de reposo conteniendo 2mM de azul de bromofenol.

HBM de estimulación-BPB: HBM de estimulación conteniendo 2mM de azul de bromofenol.

2.5.1.2-Protocolo experimental (FM1-43)

1-Partiendo de células granulares de cerebelo en cultivo de 7 DIV (también empleadas a 3 y a 14 DIV) llevar a cabo el siguiente protocolo.

2-Atemperar las células durante 10 minutos a 37°C en medio HBM de bajo potasio.

3-Incubar el cubreobjetos con las células durante 5 minutos en HBM de estimulación conteniendo $10\mu\text{M}$ de FM1-43 y $1,33\text{mM}$ CaCl_2 . Estas fueron las concentraciones estándar de no indicarse lo contrario (las variaciones en concentración de sonda y de CaCl_2 durante la carga se detallan en los protocolos gráficos).

4- Enjuagar el cubreobjetos en una placa Petri pequeña con medio HBM de reposo.

5-Montar el cubreobjetos en la cámara de perfusión (en este estudio se uso una cámara PH5 de Warner Instruments, no obstante, se pueden emplear cámaras fabricadas a mano en la tapa de una placa Petri pequeña de plástico).

6-Conectar la cámara al sistema de perfusión, montar en la pletina del microscopio y lavar, por perfusión de HBM de reposo (37°C ; v flujo= 1ml/min) durante 10 minutos. Montar en la pletina del microscopio.

7-Comenzar la adquisición de la imagen, los ajustes del equipo óptico y del programa de adquisición fueron los siguientes:

Objetivo: 60x

λ excitación: 479nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición 0.067 segundos

Ganancia electrónica: 50

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 1Hz

8-Adquirir imágenes durante un periodo de línea base de 30" y posteriormente estimular por perfusión de medio de estimulación durante un tiempo variable. Los tiempos aquí escogidos fueron o 4'30" minutos en perfusión continua (estudios de endocitosis) o bien una primera estimulación de 10" espaciada por un minuto de reposo y seguida por una estimulación de 1'30" (estudios de exocitosis).

9- Una vez finalizado el experimento, tomar una imagen en contraste de fase que servirá para ubicar los *puncta* de fluorescencia monitorizados durante el experimento y excluir regiones no sinápticas.

2.5.1.3-Protocolos gráficos

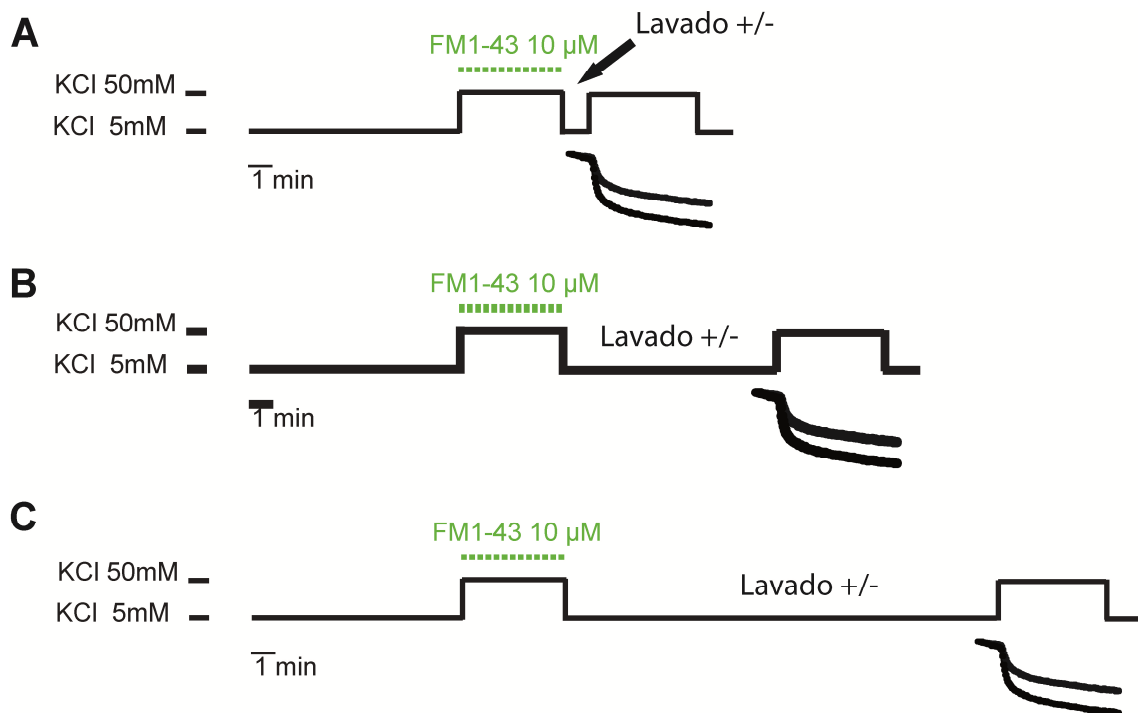


Figura 3- Protocolos gráficos del esquema experimental empleado en las variaciones de los tiempos y concentraciones de calcio durante el periodo de lavado (figuras 1, 2 y 3 de resultados) A) Tiempo de lavado=1 minuto en presencia (+) o ausencia (-) de CaCl_2 durante el lavado. B) Tiempo de lavado=10 minutos en presencia (+) o ausencia (-) de CaCl_2 durante el lavado. Protocolo estándar de FM1-43. C) Tiempo de lavado=20 minutos en presencia (+) o ausencia (-) de CaCl_2 durante el lavado. Estimulación: 5 minutos.

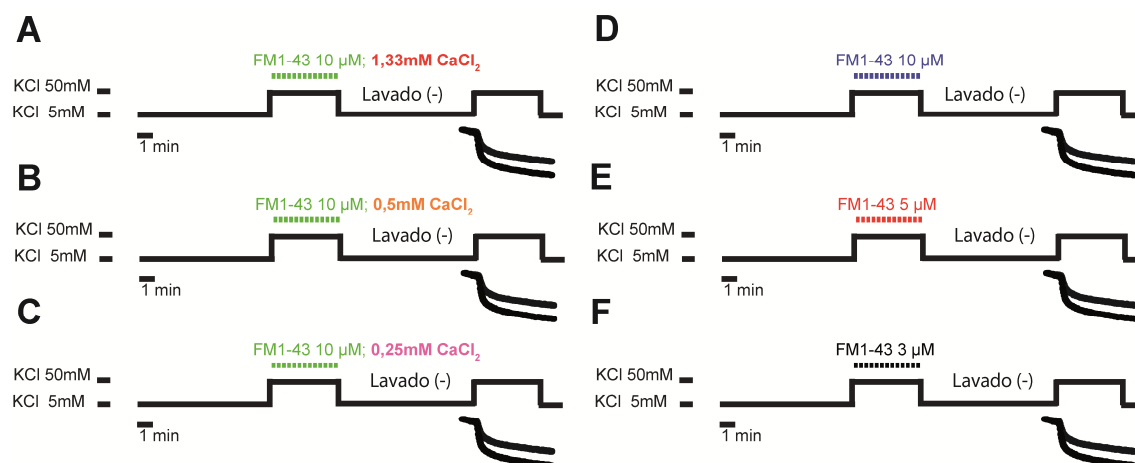


Figura 4- Variaciones de la concentración de calcio durante el periodo de carga en A (1,33mM CaCl_2) B (0,5mM CaCl_2) y C (0,25mM CaCl_2). Variaciones de la concentración de FM1-43 durante el periodo de carga en D (3 μ M FM1-43), E (5 μ M FM1-43) y F (10 μ M FM1-43). Figuras 4 y 5 respectivamente. De no indicarse lo contrario la concentración de CaCl_2 durante la carga será de 1,33mM a partir de ahora. Estimulación 5 minutos en todos los casos.

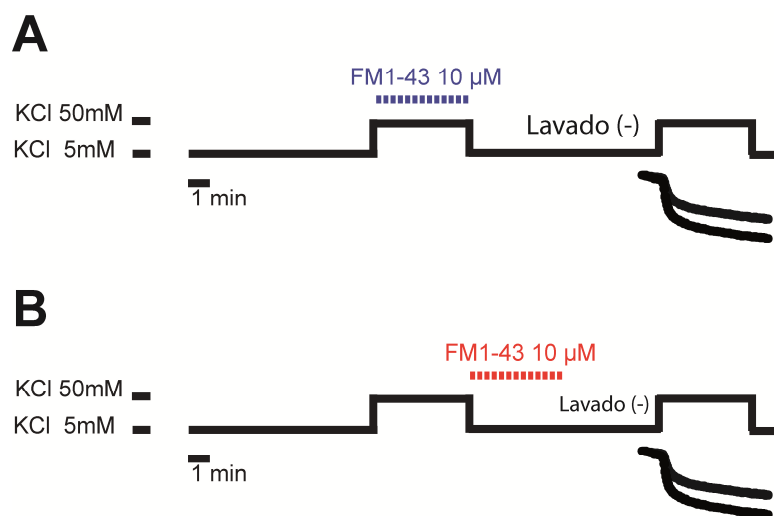


Figura 5- Esquema de carga en control (A) y en condiciones de carga asincrónica (B) en la que la sonda se pone en contacto con la preparación después de la estimulación con objeto de detectar formas de endocitosis lenta que persisten tras la estimulación. Lavado en ausencia de CaCl_2 . Estimulación 5 minutos.

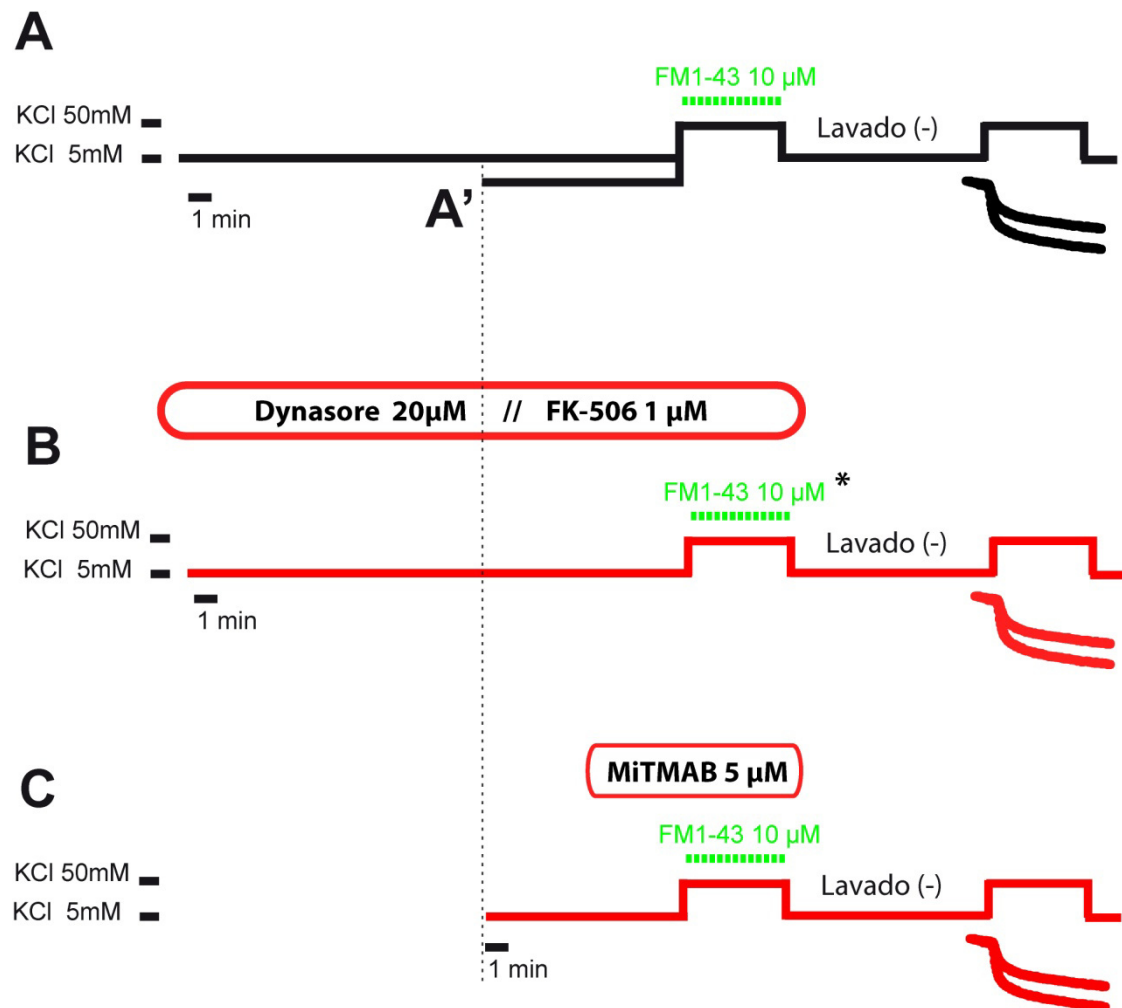


Figura 6- Esquema de carga en control de las figuras 7 y 9 de resultados (A) y en la figura 8 (A'). Los tratamientos tanto con Dynasore como con FK-506 (figuras 7 y 9 de resultados, respectivamente) se llevaron a cabo durante los 25 minutos previos a la carga, y durante la fase de incorporación a las concentraciones indicadas en (B); * téngase en cuenta que, en el caso de la figura 7 de resultados, el protocolo de carga de la sonda se llevó a cabo a distintas concentraciones de calcio, tanto en control como en las células tratadas con Dynasore. En (C) se muestra el protocolo de carga empleado para los experimentos con MiTMAB (figura 8 de resultados). Estimulación 5 minutos.

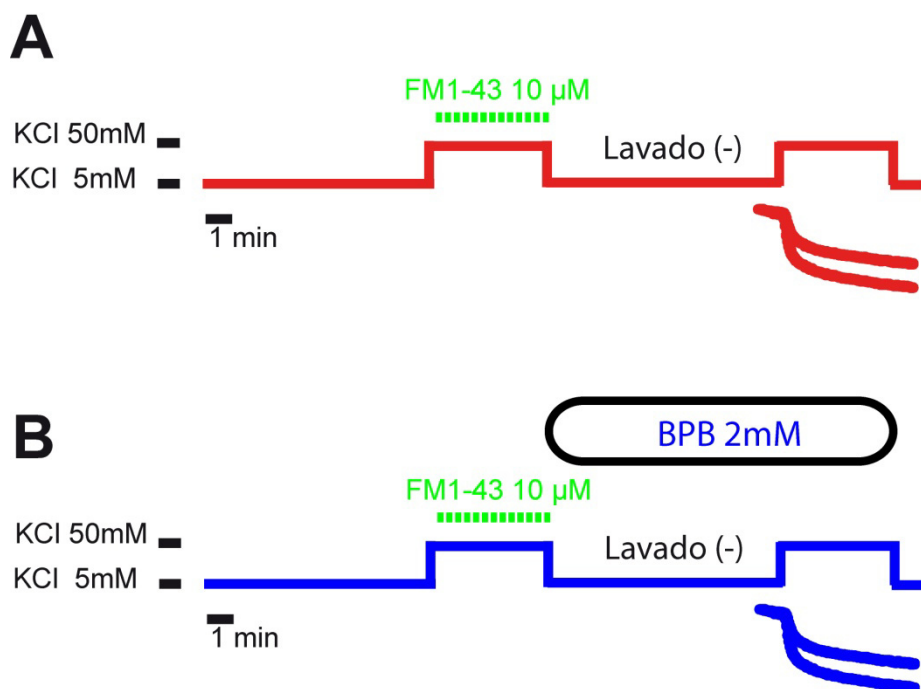


Figura 7- Esquema del protocolo empleado en los experimentos de FM1-43 y azul de bromofenol en control (A) y perfundiendo azul de bromofenol durante el lavado y durante la estimulación (B). 5 minutos de estimulación en ambos.

Los tratamientos prolongados se llevaron a cabo mediante incubación en el medio de cultivo (Neurobasal A con B-27) durante las 24 horas previas al experimento a las siguientes concentraciones: TTx, 1 μ M (figura 14 de resultados); Daidzeina, 500 nM; T0070907, 1 μ M (figura 15 de resultados); PTx, 2 μ g/ml (figura 18 de resultados); SR141716, 5 μ M (figura 19 de resultados). Para todos ellos se empleó el protocolo descrito en la figura 2B de métodos, como control se emplearon células no tratadas.

Para los estudios de exocitosis se llevaron a cabo pequeñas modificaciones de los tiempos de carga y de la segunda estimulación que se detallan en los esquemas que siguen.

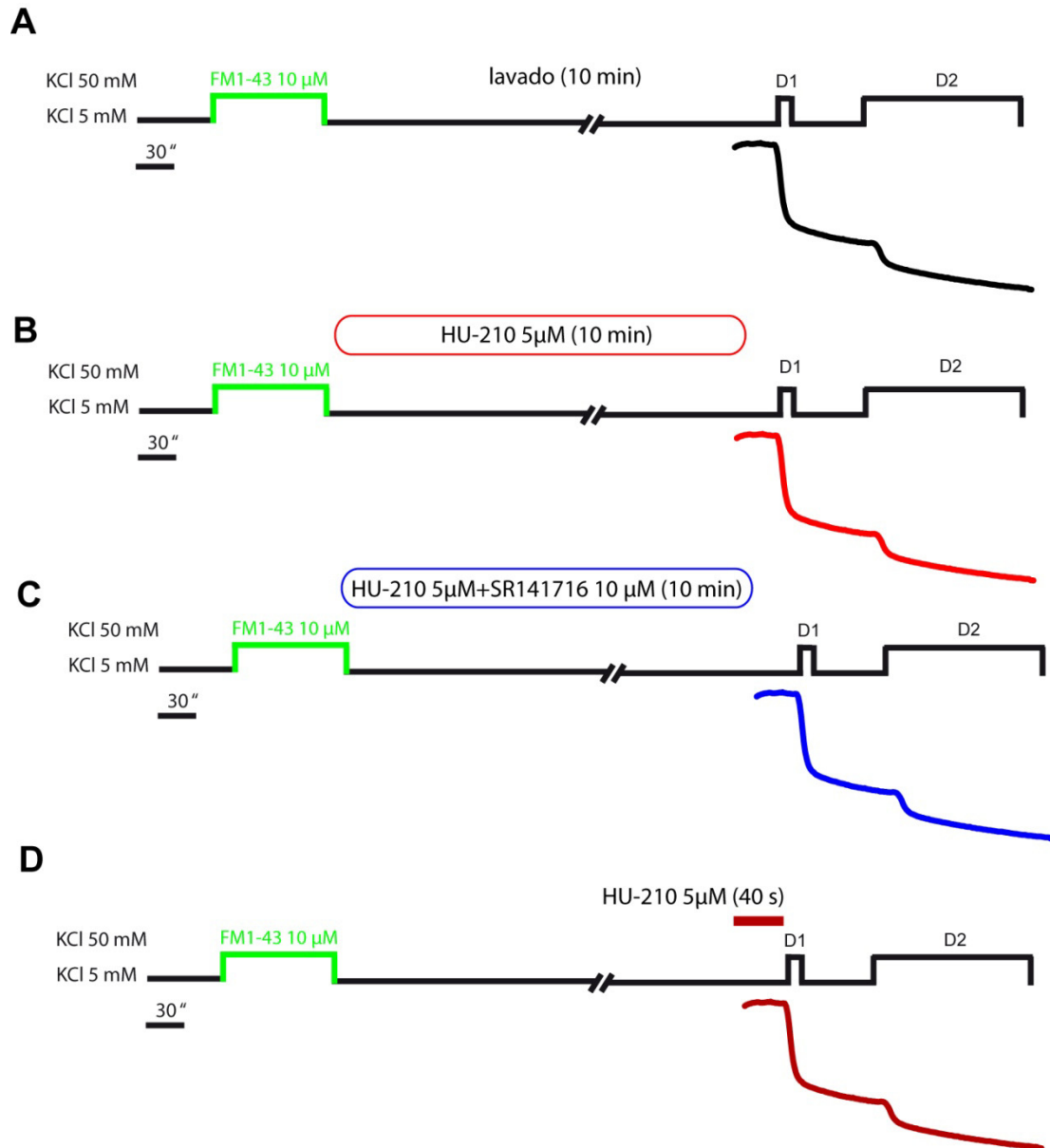
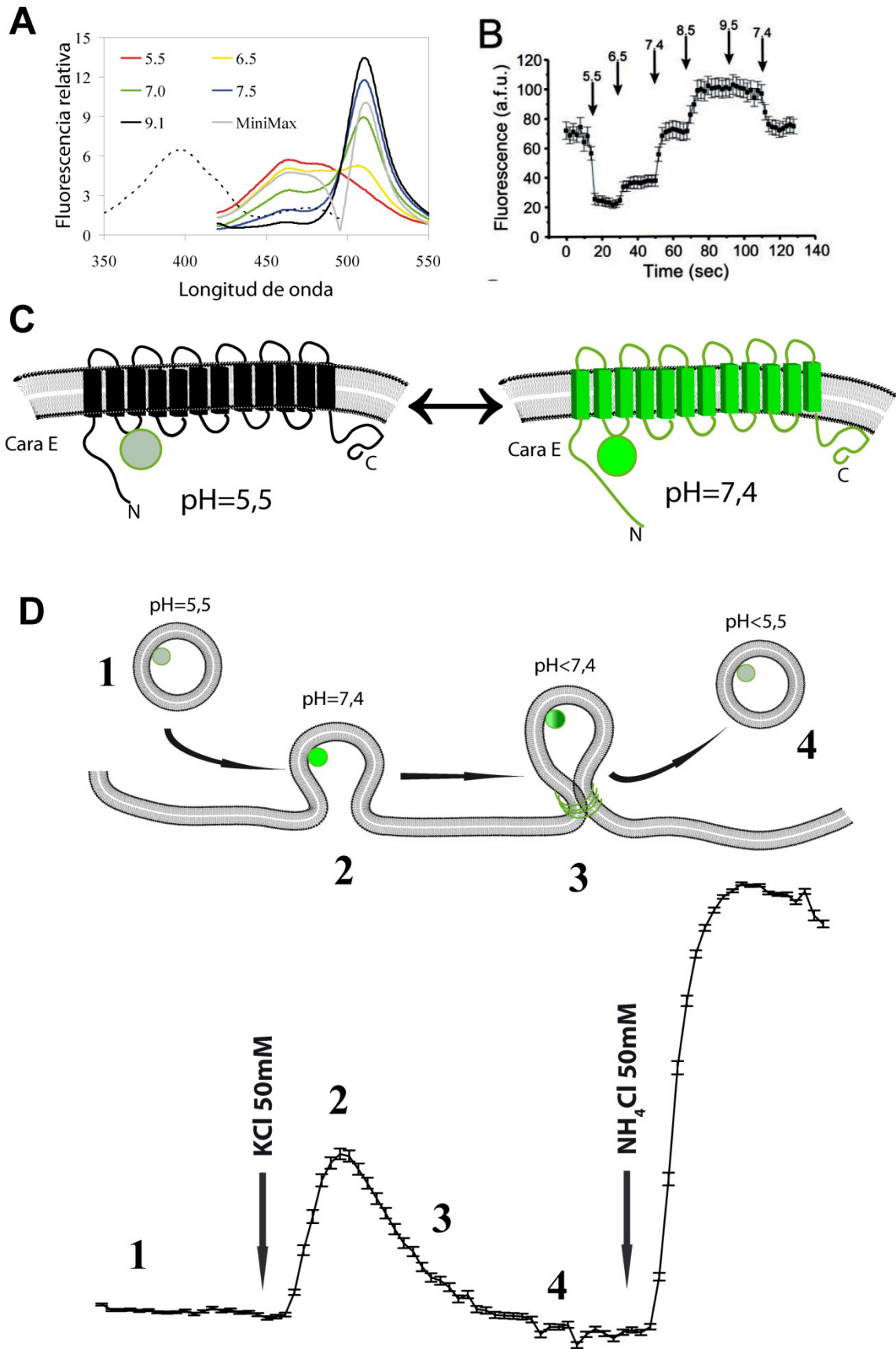


Figura 8- Esquema del protocolo empleado en los experimentos de FM1-43 y activación del receptor CB1; la estimulación consiste en 10" (D1) un tiempo de reposo y una perfusión de 2'30" con medio de estimulación (D2). A) Control; B) HU-210 C) HU-210 + SR141716; D) Tratamiento breve con HU-210 (40" antes de la estimulación). A, B, y C en la figura 20 de resultados; A y D figura 21. El periodo de carga fue de 2 minutos en todos los casos.

2.5.2-VGluT1-pHluorina

Las pHluorinas son indicadores de pH codificados genéticamente. Diseñadas por primera vez por Miesenbock (Miesenbock *et al.*, 1998), consisten en una proteína endógena modificada con una versión de la proteína fluorescente verde que exhibe una extraordinaria sensibilidad al pH. Esta versión modificada de la GFP está apagada a pHs ácidos (pH=5,5; lumen vesicular), mientras que emite fluorescencia a pHs neutros (pH=7,4; espacio extracelular). Años después se introdujo una nueva modificación en estas herramientas codificadas genéticamente, ya que la copia de GFP se sustituyó por otra versión de la proteína cuya medida no es ratiométrica, ya que el espectro de emisión posee un solo máximo, a la que se denominó pHluorina eclíptica (Sankaranarayanan y Ryan, 2001). Posteriormente la sustitución de la GFP por la EGFP (del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Heim *et al.*, 1995), llevó al desarrollo de la pHluorina super eclíptica (Ng *et al.*, 2002). La pHluorina empleada en este estudio está constituida por una pHluorina supereclíptica situada entre los bucles 1 y 2 transmembrana (orientada hacia la cara E o luminal) del transportador vesicular de glutamato de tipo 1, conocida como VGluT-pHluorina (Voglmaier *et al.*, 2006; Balaji y Ryan, 2007).

→ **Figura 9-** A) Espectro de emisión de la pHluorina supereclíptica a diferentes pH (distintos colores). Adaptado de (Schulte *et al.*, 2006). B) Se muestra el efecto de la variación de pH sobre la fluorescencia de la Sy-pHluorina en este caso, en copias expresadas en neuronas vivas. Adaptado de (Sankaranarayanan y Ryan, 2001). C) Ilustración esquemática del cambio de fluorescencia en la VGluT1-pHluorina respuesta a las variaciones de pH del lumen vesicular; la pHluorina supereclíptica entre TM1 y TM2 se representa como un círculo. D) Esquema de las variaciones de fluorescencia paralelas a la sucesión de acontecimientos del ciclo vesicular, 1) Reposo; 2) Exocitosis vesicular; 3) Endocitosis; 4) Re-acidificación. Se indican los cambios de pH del lumen de la vesícula sináptica. El registro de fluorescencia que se obtendría tras poner en marcha la fusión vesicular en neuronas que expresan esta proteína se indica con números que corresponden a las fases del ciclo vesicular ilustrado previamente.



La estimulación neuronal provoca la fusión de las vesículas con la membrana presináptica y por tanto la neutralización del lumen de las vesículas sinápticas, o lo que es lo mismo, un flujo neto de protones hacia el espacio extracelular. Este cambio en pH se traduce en un incremento rápido de la fluorescencia neta de la GFP durante la fase exocitótica del ciclo vesicular, seguido de un descenso lento y progresivo de la fluorescencia inducido por la endocitosis y la re-acidificación de las vesículas sinápticas. Posteriormente, por perfusión de una solución de NH_4Cl , podemos promover la salida de protones del interior de las vesículas, lo que neutralizará el lumen vesicular de forma independiente de la exocitosis y por tanto dará lugar a una señal máxima a la que normalizar el aumento de fluorescencia monitorizado durante la estimulación. De este modo es posible estimar la fracción (porcentaje) de vesículas excitadas durante un estímulo, respecto al total de vesículas sinápticas presentes en sinapsis individuales. Las principales ventajas de la monitorización del ciclo vesicular con VGluT1-pHluorina frente a la monitorización de este proceso con FM1-43 son I) la ausencia de un paso de estimulación previo al experimento para la incorporación de la sonda y II) la posibilidad de monitorizar la fase endocitótica del ciclo vesicular. Una ventaja de este sistema es la alta reproducibilidad de los experimentos entre rondas de estimulación sucesivas. Esto permite tener un control interno a la hora de efectuar comparaciones una vez realizados tratamientos farmacológicos.

2.5.2.1-Tampones

HBM de reposo: (del inglés *Hepes Buffer Medium* NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

HBM de estimulación (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH=7,4).

HBM de alcalinización de vesículas sinápticas: (del inglés *Hepes Buffer Medium* NaCl 90mM, NH₄Cl 50mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

2.5.2.2- Protocolo

1-Partiendo de células electroporadas a 0 DIV (como se indica en el apartado 2.1.1.3) y mantenidas hasta 7 DIV.

2-Atemperar las células durante 10 minutos a 37°C en medio HBM de bajo potasio.

3-Montar el cubreobjetos en la cámara de perfusión (en este estudio se uso una cámara PH5 de Warner Instruments, no obstante, se pueden emplear cámaras fabricadas a mano en la tapa de una placa Petri pequeña de plástico).

4-Conectar la cámara al sistema de perfusión y lavar, por perfusión de HBM de reposo (37°C; v flujo= 1ml/min). Montar en la pletina del microscopio.

5-Comenzar la adquisición de imagen, los ajustes del equipo óptico y del programa de adquisición fueron los siguientes:

Objetivo: 60x

λ excitación: 475nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición 0.250 segundos

Ganancia electrónica: 100

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 4Hz (las 4 imágenes se promediaron para mejorar la relación señal ruido) dando lugar a una tasa real de aproximadamente 1Hz.

6-Adquirir un periodo de línea base de 30" y posteriormente estimular por perfusión de medio de estimulación durante un tiempo variable. Los tiempos aquí escogidos fueron o 10" en perfusión continua o 20" en el caso de desearse llevar a cabo una sobre-estimulación neuronal. Posteriormente pasar a perfusión de HBM de reposo durante 50". Finalmente, perfundir 30" de la solución de alcalinización con objeto de obtener un máximo de señal para normalizar posteriormente.

7-Se puede repetir el paso 8 tantas veces como se desee, llevando a cabo tratamientos farmacológicos en los periodos entre experimentos.

8- Una vez finalizado el experimento, tomar una imagen en contraste de fase que servirá para ubicar los *puncta* de fluorescencia monitorizados durante el experimento y excluir regiones no sinápticas.

2.5.2.3-Protocolos gráficos.

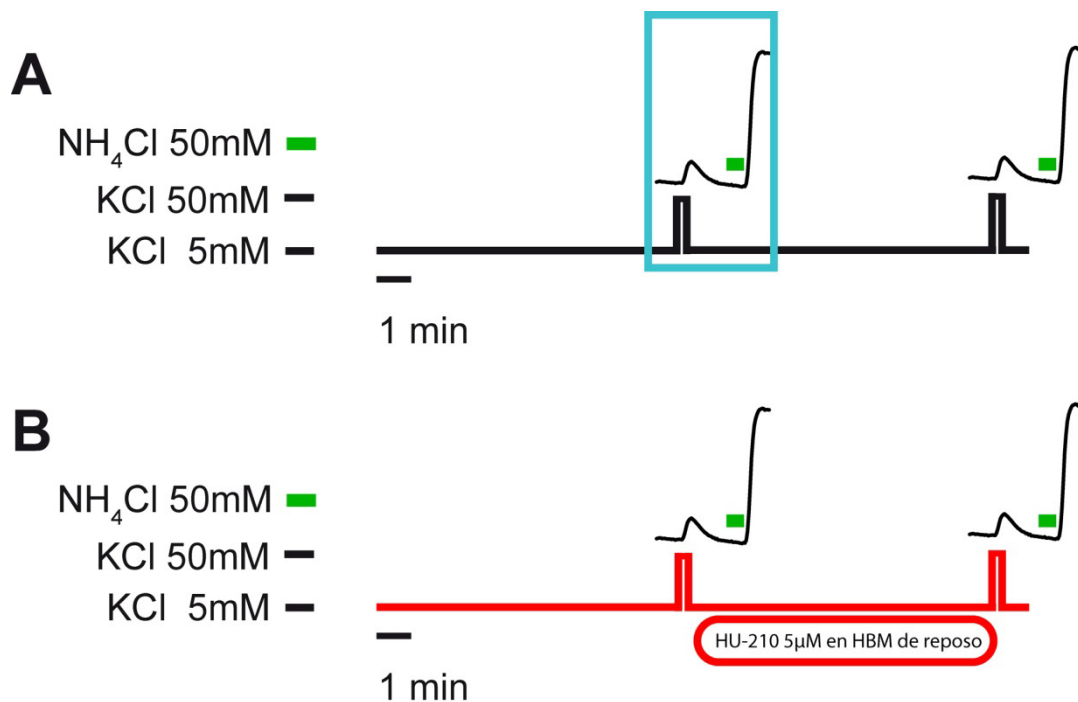


Figura 10- Protocolos gráficos del esquema experimental empleado en los experimentos de doble pulso en VGluT1-pHluorina en control (A) y con un tratamiento de 10 minutos con HU-210 (5µM) entre las estimulaciones (B). En la figura 22 de resultados, el tampón de estimulación empleado contenía 1,33mM CaCl₂ para ambos protocolos. En la figura 24 de resultados, el tampón de estimulación empleado contenía 5mM CaCl₂. En la figura 23 se empleó el protocolo en A con una gradación de los niveles de CaCl₂ durante la estimulación (0,25; 1,33 y 5mM). El segmento recuadrado en el protocolo A corresponde al paso 8 del protocolo detallado en 2.5.2.2; 30" reposo / 10" estimulación / 50" reposo /30" alcalinización. El protocolo empleado en la figura 25 corresponde al pulso posterior a la incubación del HU-210 y la estimulación se llevó a cabo durante 20" en un medio conteniendo 5mM CaCl₂.

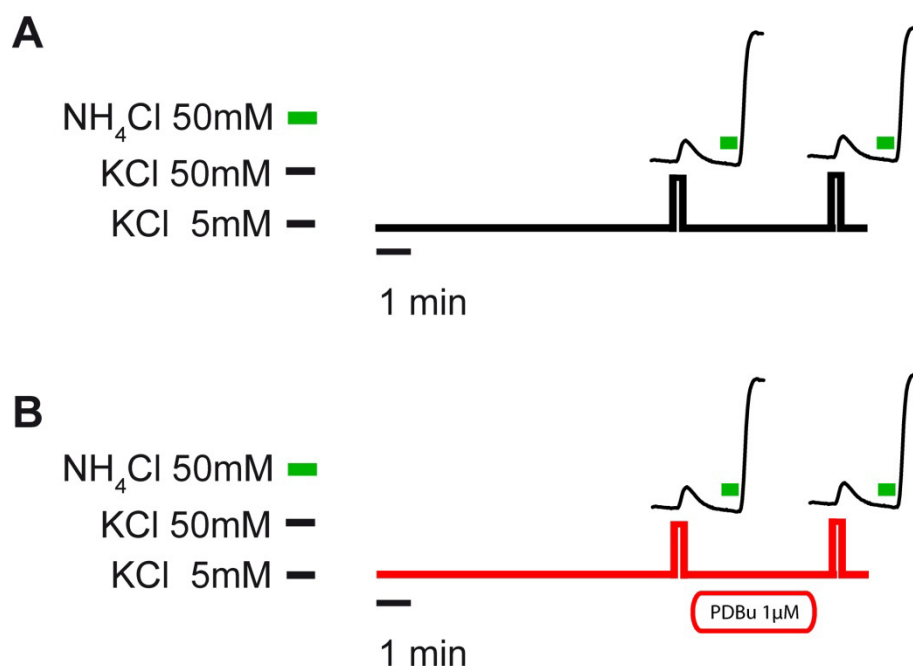


Figura 11- Protocolos gráficos del esquema experimental empleado en los experimentos de doble pulso en VGluT1-pHluorina en control (A) y con un tratamiento de 5 minutos con PDBu (1μM) entre las estimulaciones (B). Corresponde a la figura 26 de resultados. Nótese que se llevaron a cabo dos protocolos, en uno se estimuló a 0.25mM CaCl₂ y en otro a 1,33mM CaCl₂.

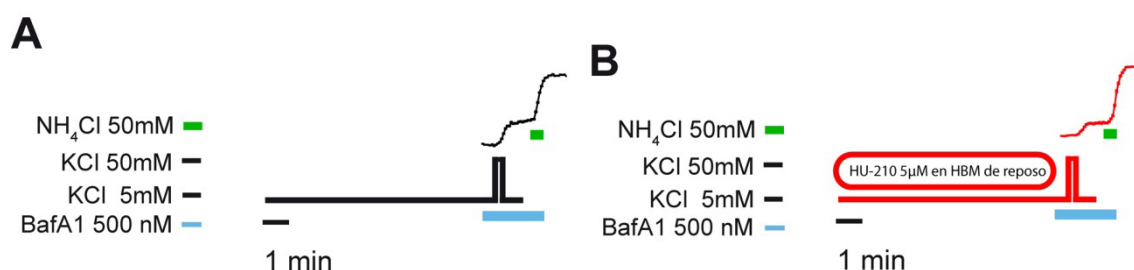


Figura 12- Protocolos gráficos del esquema experimental empleado en los experimentos de Bafilomicina en control (A) y tras tratar con HU-210 (B) La bafilomicina se empleó a 500 nM a partir de los 20" previos al comienzo de la estimulación y hasta el final del experimento. Los tiempos de línea base y estimulación son los descritos en el punto 8 del protocolo experimental.

Los protocolos gráficos de las incubaciones farmacológicas de las figuras 32, 33 y 34 de resultados se indican en la misma figura, ha de tenerse en cuenta que tras la incubación con los distintos agonistas/antagonistas o activadores/inhibidores se llevó a cabo el protocolo descrito en el paso 6 de 2.5.2.2 (protocolo recuadrado en la figura 10A de métodos).

2.5.3-Fura2-AM

Con objeto de determinar las variaciones intracelulares de calcio en neuronas individuales se utilizó la sonda fluorescente Fura-2 AM. Esta es una sonda hidrofóbica, lo que le permite atravesar la membrana plasmática y alcanzar el interior celular, donde las esterasas citoplásmicas hidrolizan su enlace éster. El Fura-2 liberado queda confinado en el citoplasma donde se une al Ca^{2+} libre para formar el complejo Ca^{2+} -Fura, que da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose además un desplazamiento en el máximo de su espectro de excitación de 380 nm a 340 nm. Posteriormente el valor obtenido de dividir entre el valor de fluorescencia emitida al excitar a 340nm y el valor obtenido al excitar a 380nm obtendremos una señal ratiométrica que incrementará de forma paralela a la concentración intracelular de calcio. Esta técnica se empleó para medir la reducción en la entrada de calcio en respuesta a la aplicación del agonista CB1.

2.5.3.1-Tampones

HBM de reposo: (del inglés *Hepes Buffer Medium* NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH 7,4).

HBM de estimulación (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH=7,4).

2.5.3.2-Protocolo

1- Partiendo de neuronas granulares de cerebelo de 7DIV en cubreobjetos de 15mm de diámetro.

2- Incubar durante 50 minutos a 37°C en HBM de reposo conteniendo 5μM de la sonda FURA2-AM.

3-Enjuagar brevemente las células en una placa Petri pequeña conteniendo medio de reposo.

4-Montar las células en la cámara, conectar al sistema de perfusión y lavar, durante 10 minutos, por perfusión de HBM de reposo (37°C; v flujo= 1ml/min).

5-Comenzar la adquisición de imagen, los ajustes del equipo óptico y del programa de adquisición fueron los siguientes:

Objetivo: 40x

λ excitación: 340nm/380nm

Ventana: 502x501 pixeles

Tiempo de exposición 0.050 segundos

Ganancia electrónica: 100

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 2Hz (una medida en cada longitud de onda por segundo).

6-El protocolo consistió en estimulaciones secuenciales por perfusión, durante 10 segundos, de HBM de estimulación. En los periodos de reposo se incubó durante 1 o 10 minutos con HU-210 5 μ M.

7-Al finalizar el experimento, realizar una foto en contraste de fase y perfundir, durante 3 minutos, medio de estimulación conteniendo 10 μ M FM1-43. Lavar posteriormente durante 10 minutos con HBM de reposo. Esto delimitará las regiones sinápticas para el análisis posterior.

8- Adquirir una imagen del marcaje de FM1-43 (* los ajustes del equipo han de ser los descritos en 2.5.1.2).

2.6-Microscopía electrónica

2.6.1-Tampones

-Tampón Millonig: Tampón fosfato 0,1 M; 1,87% NaH_2PO_4 (p/v), 0,38 % NaOH (p/v); pH=7.4.

-Tampón de fijación I: 4% Paraformaldehído; 2,5 % Glutaraldehído en Tampón Millonig.

-Tampón de fijación II (Osmicación): 1% OsO_4 ; 1,5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

-Soluciones de deshidratación: Soluciones de etanol/acetona de concentración creciente desde 30% hasta etanol/acetona absoluto/a.

2.6.2-Protocolos

2.6.2.1 Microscopía de sinaptosomas

1-Los sinaptosomas, obtenidos en el paso 9 del protocolo 2.2, se mantuvieron 1h a 37°C en la que fueron tratados con el agonista del receptor CB1, HU-210 (5 μM en HBM, 10 minutos) o bien con HBM un periodo equivalente.

2-Lavado en tampón Millonig a 37°C, pH=7,3 por resuspensión del precipitado conteniendo los sinaptosomas. Centrifugar 1 minuto a 10.000g.

3- Fijar en tampón de fijación I, 2 horas a 4°C.

4-Lavar en tampón Millonig a 4°C y centrifugar 2 minutos a 245g (x2).

5-Lavado o/n en tampón Millonig a 4°C. Centrifugar 2 minutos a 245g. Descartar el sobrenadante.

6-Postfijación y osmicación: Añadir en el tubo eppendorf Tampón de fijación II y mantener 1h a 4°C.

7-Retirar el tampón de fijación II e inactivar los residuos con leche en polvo, esto disminuye su toxicidad. Lavar con agua destilada (x3).

8-Deshidrataciones en concentraciones crecientes de acetona

- Acetona 30%; 15 minutos
- Acetona 50% ; 15 minutos
- Acetona 70% ; 15 minutos
- Acetona 80% ; 15 minutos
- Acetona 90% ; 15 minutos
- Acetona 95% ; 15 minutos
- Acetona 100%; 15 minutos (x2)

9-Inclusión en concentraciones crecientes de resina SPURR.

- Resina / acetona 1/3; 1h
- Resina / acetona 1:1; 1h;
- Resina / acetona 3/1; 2h
- Resina pura; o/n

10- Cambiar la resina pura del último paso por resina pura fresca y mantener 48 horas a 60°C, lo que da lugar a la polimerización de la resina. Los bloques de resina se cortaron en el centro nacional de microscopía electrónica (C.N.M.E.).

2.6.2.2 Microscopía de células

1-Partiendo de neuronas granulares de cerebelo de 7DIV (paso 13 del protocolo 2.1.1.2) sembradas en placas de 6 pocillos, retirar el medio de cultivo NeurobasalA y añadir HBM atemperado a 37°C, mantener 10 minutos en incubador de células.

2-Retirar el HBM y añadir HBM atemperado a 37°C conteniendo el tratamiento farmacológico, o bien proceder al protocolo de estimulación. En el trabajo aquí descrito, los tratamientos empleados fueron los siguientes, descritos en función del proceso que perseguían caracterizar:

a-Para los estudios en endocitosis y reciclamiento, figura 11 de resultados (6 Condiciones):

Control:

Basal: Células mantenidas 10 minutos adicionales en HBM (*Hepes Buffer Medium*: NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

Estimulación en 1,33mM CaCl₂: Células mantenidas 10 minutos en HBM de reposo (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4). Posteriormente fueron estimuladas en medio HBM de alto potasio (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; **1,33mM CaCl₂**; pH=7,4) durante 5 minutos. Mantener en reposo los 10 minutos posteriores a la estimulación.

Estimulación en 0,25mM CaCl₂: Células mantenidas 10 minutos en HBM de reposo (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄, pH=7,4). Posteriormente fueron estimuladas en medio HBM de estimulación (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; **0,25mM CaCl₂**; pH=7,4) durante 5 minutos. Mantener en reposo los 10 minutos posteriores a la estimulación.

Dynasore (inhibidor de la actividad catalítica de la dinamina):

El tratamiento con Dynasore 20 μ M en HBM se mantuvo desde los 20 minutos comprendidos desde la retirada del medio de cultivo en el paso 1 de este protocolo hasta el periodo posterior a la estimulación (esta incluida).

Basal: Células mantenidas 20 minutos en HBM (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 20 μ M Dynasore; pH 7,4).

Estimulación en 1,33mM CaCl₂: Células mantenidas 10 minutos en HBM de reposo (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4). Posteriormente fueron estimuladas en medio HBM de estimulación (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; **1,33mM CaCl₂**; 20 μ M Dynasore; pH=7,4) durante 5 minutos. Mantener en reposo los 10 minutos posteriores a la estimulación.

Estimulación en 0,25mM CaCl₂: Células mantenidas 10 minutos en HBM de reposo (137mM NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄; 20 μ M Dynasore pH=7,4). Posteriormente fueron estimuladas en medio HBM de alto potasio (NaCl 95mM, KCl 50mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; **0,25mM CaCl₂**; 20 μ M Dynasore; pH=7,4) durante 5 minutos. Mantener en reposo los 10 minutos posteriores a la estimulación.

b-Para los estudios del receptor CB1, relacionados con aspectos exocitóticos:

Control: Células mantenidas 10 minutos adicionales en HBM (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

HU-210: Células tratadas durante los 10 minutos con HU-210 5μM en HBM (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; pH 7,4).

3-Lavado en tampón Millonig a 37°C, pH=7,3 (en placa).

3- Fijar en tampón de fijación I, 2 horas a 4°C (en placa).

4-Lavar en tampón Millonig a 4°C. (x2; en placa).

5-Lavado o/n en tampón Millonig a 4°C (en placa).

6-Postfijación y osmicación: Añadir sobre el pocillo de la placa de cultivo Tampón de fijación II y mantener 1h a 4°C (en placa).

7-Retirar el tampón de fijación II e inactivar los residuos con leche en polvo, esto disminuye su toxicidad. Lavar con agua destilada (x3; en placa)

8-Deshidrataciones en concentraciones crecientes de etanol

- Etanol 30%; 15 minutos
- Etanol 50% ; 15 minutos
- Etanol 70% ; 15 minutos
- Etanol 80% ; 15 minutos
- Etanol 90% ; 15 minutos
- Etanol 95% ; 15 minutos
- Etanol 100%; 15 minutos (x2)

9-Despegar la monocapa de células con pipeteos enérgicos de óxido de propileno. Es importante ser diligente, pues el óxido de propileno ataca el plástico de la placa, lo que puede contaminar la muestra. Recoger la monocapa en un tubo eppendorff. Centrifugar a 750g durante 2 minutos, descartar el sobrenadante.

10-Inclusión en concentraciones crecientes de resina SPURR en tubos eppendorff

- Resina / etanol 1/3; 1h
- Resina / etanol 1:1; 1h;
- Resina / etanol 3/1; 2h
- Resina pura; o/n

11- Cambiar la resina pura del último paso por resina pura fresca y mantener 48 horas a 60°C, lo que da lugar a la polimerización de la resina. Los bloques de resina se cortaron en el centro nacional de microscopía electrónica (C.N.M.E.).

2.7-Niveles de cAMP

1-Partiendo de células granulares de cerebelo en cultivo de 9/10 DIV en placas de 96 pocillos.

2-Incubar en HBM de reposo (NaCl 140mM, KCl 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1,2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 10mM y HEPES 10mM; 1,33mM CaCl₂; pH 7,4) con 1mM IBMX. Los tratamientos se llevaron a cabo a las siguientes concentraciones: HU-210, 5µM; Forskolina 1µM; SQ-22536, 100µM. Incubar durante 30 minutos a 37°C

3-Lisar las células y proceder como se indica en el kit *cAMP dynamic 2 detection kit*.

4-Realizar las medidas de fluorescencia en un lector de placas, en este caso el equipo empleado fue un Fluos-STAR OMEGA.

2.8- Inmunocitoquímica *Post-hoc*

La técnica de la inmunocitoquímica *post-hoc* surge de combinar los experimentos de funcionalidad de FM1-43 con técnicas clásicas de inmunocitoquímica (Ramirez-Franco *et al.*, 2013). El protocolo se detalla a continuación y se incorpora en su formato de publicación en el anexo I Los tampones empleados no se detallarán por quedar recogidos en las secciones correspondientes

2.8.1-Protocolo

1-Partiendo de células granulares de cerebelo en cultivo de 7 DIV (también empleadas a 3 y a 14 DIV) llevar a cabo el siguiente protocolo.

2-Atemperar las células durante 10 minutos a 37°C en medio HBM de bajo potasio.

3-Incubar el cubreobjetos con las células durante 5 minutos en HBM de estimulación conteniendo 10 μ M de FM1-43 y 1,33mM CaCl₂. Estas fueron las concentraciones estándar de no indicarse lo contrario (las variaciones en concentración de sonda y de CaCl₂ durante la carga se detallan en los protocolos gráficos).

4- Enjuagar el cubreobjetos en una placa Petri pequeña con medio HBM de reposo.

5-Montar el cubreobjetos en la cámara de perfusión (en este estudio se uso una cámara PH5 de Warner Instruments, no obstante, se pueden emplear cámaras fabricadas a mano en la tapa de una placa Petri pequeña de plástico)

6-Conectar la cámara al sistema de perfusión y lavar, por perfusión de HBM de reposo (37°C; v flujo= 1ml/min) durante 10 minutos. Montar en la pletina del microscopio.

7-Comenzar la adquisición de imagen, los ajustes del equipo óptico y del programa de adquisición fueron los siguientes:

λ excitación: 479nm

Ventana: 1004x1002 pixeles

Tiempo de exposición 0.067 segundos

Ganancia electrónica: 50

Pre-Amplificación de la ganancia: 3.80

Profundidad en bits: 14

Tasa de adquisición de imágenes: 1Hz

8-Proceder como se indica en los protocolos gráficos de estimulación de doble pulso (Figura 8A de métodos).

9- Una vez finalizado el experimento, tomar una imagen en contraste de fase que servirá para ubicar los *puncta* de fluorescencia monitorizados durante el experimento y excluir regiones no sinápticas. Tomar varias imágenes a menor magnificación (40x y 20x) con objeto de reconstruir el máximo área posible del cubreobjetos, siempre identificando el campo de partida.

10-Desmontar cuidadosamente la cámara de perfusión y recuperar el cubreobjetos con las células.

11- Enjuagar en PBS 1x a 37°C y proceder al protocolo de inmunocitoquímica detallado en la sección 2.4 de métodos.

12- Buscar en 20x el campo sobre el que se realizó el experimento de imagen, emplear para ello la reconstrucción llevada a cabo a partir de las imágenes del apartado 9 de este protocolo.

13- Aumentar la magnificación sobre el campo del experimento (60x) y tomar las imágenes de fluorescencia correspondientes al marcaje contra las proteínas de interés.

3-Procesamientos informáticos

3.1- Inmunodetección en membranas

Las imágenes se procesaron de forma semi-automatizada con el *software* incorporado con dispositivo de escaneo de membranas (Odyssey). Se procedió a la medida de la densidad integrada de una proteína de interés y de una proteína a la que relativizar el valor de esta primera (control de carga). Los distintos valores se normalizaron al valor del cociente obtenido a 3DIV, usando para ello el programa microsoft excel.

3.2- FM1-43

Se hizo uso del método semi-automatizado descrito por Bergsman (Bergsman *et al.*, 2006) con ligeras modificaciones (Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Ramirez-Franco *et al.*, 2013). Este método permite la selección automática de regiones cuyo comportamiento tras la estimulación es compatible con el de una región sináptica, atendiendo a tres características: I) la tasa de descarga del periodo de línea base (estabilidad de la señal); II) la relación señal/ruido de la línea base (ruido de la señal) y III) el grado de descarga tras la estimulación. Se detalla el procesamiento a modo de protocolo informático

1-Almacenar las imágenes obtenidas tras el paso 8 del protocolo 2.5.1.2 en un archivo *.tiff multidimensional. Descomponer en secuencia de imágenes en una carpeta con nombre conocido, renombrando las imágenes individuales desde cover001.tiff hasta covernnn.tiff. Guardar en esta misma carpeta la imagen obtenida en contraste de fase y renombrar como *cel.tiff*.

2- Ejecutar la macro BatchImageProcess en IgorPro 6.31 y proceder como se detalla en la figura a continuación, una vez finalizado ejecutar "go" en el panel lateral.

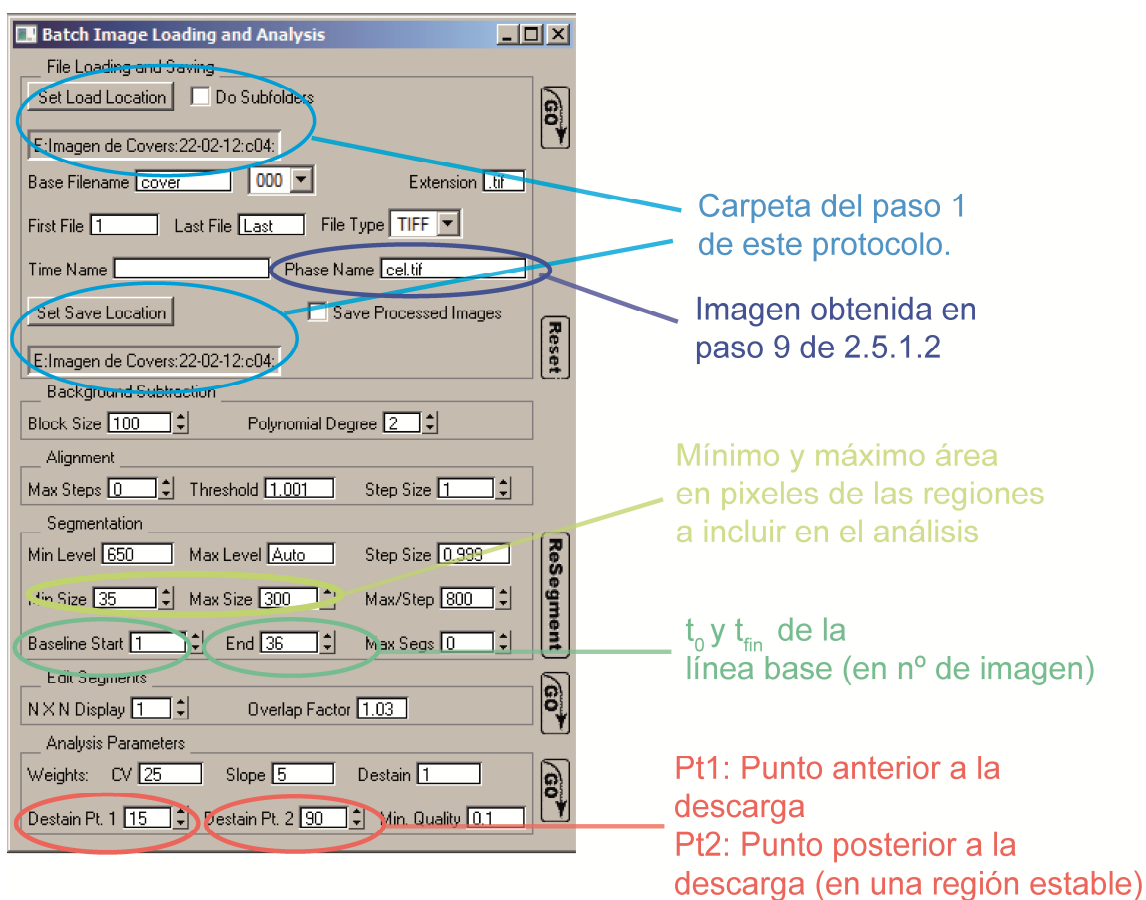


Figura 13- Consola de IgorPro empleada para el procesamiento semiautomatizado de los experimentos de FM1-43.

3- Una vez finalizado el procesamiento aparece una consola en la que debemos pulsar "leave folder alone", esta operación guarda una copia del experimento con el fondo sustraído automáticamente mediante una estrategia iterativa basada en el algoritmo de *bola rodante* (Sternberg, 1983). Acceder a Data> Browse waves > QualitySegment+ (nombre de la carpeta) y guardar una copia. Este es un archivo *.ibw que alberga la máscara binaria empleada posteriormente para analizar el experimento.

4-Mediante el programa ImageJ, importar las imágenes procesadas automáticamente contenidas en una subcarpeta contenida la carpeta original del paso 1. Acceder a File>Import>Raw y proceder como se indica en la figura 14A (genera un *.tiff multidimensional). Importar también la máscara binaria obtenida en el paso 3, siguiendo las opciones en la figura 14B. Posteriormente, sobre la imagen que aparece ejecutar Process>Binary>Make binary. A partir de esta imagen hemos de generar un conjunto de regiones de interés (ROI's), para ello acceder a Analyze>Analyze particles y proceder como en la figura 14C.

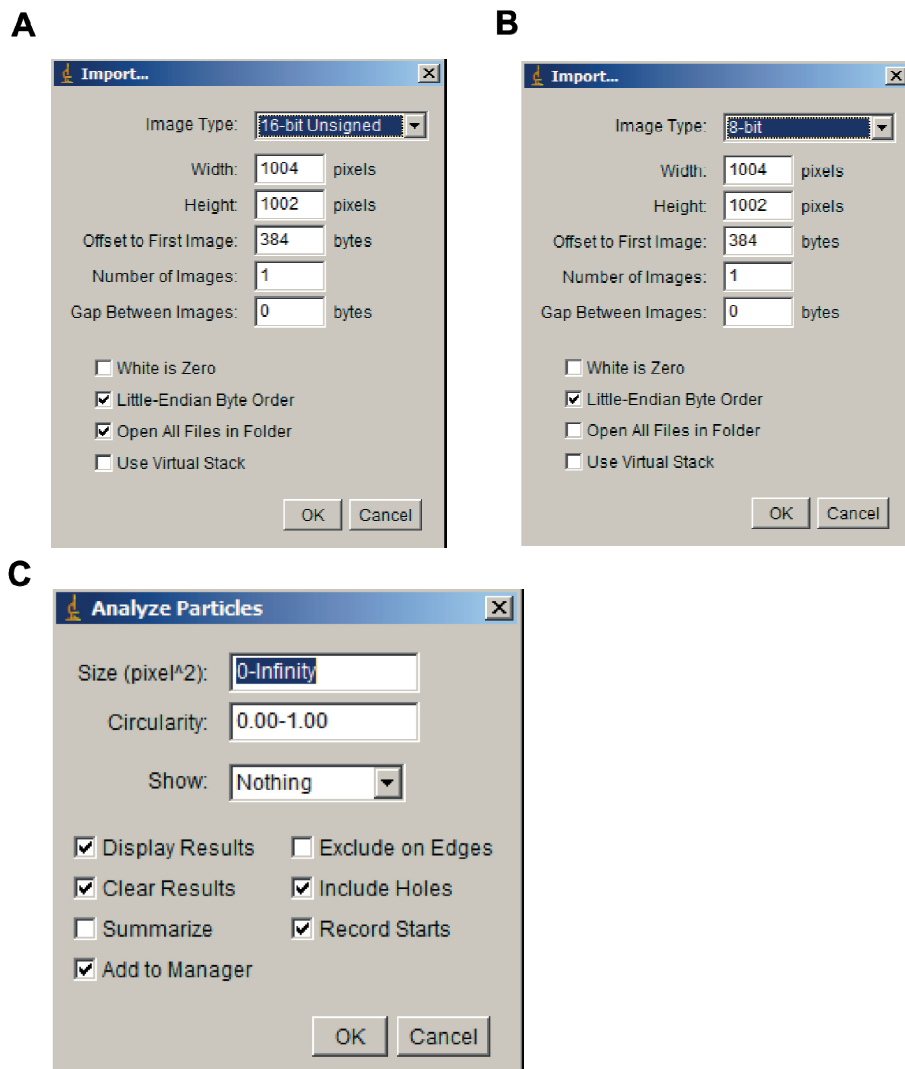


Figura 14- Opciones a marcar durante los distintos pasos descritos en el paso 4.

5-Guardar el ROIset.zip que se genera, contiene la información de la máscara del experimento (More>Save). Ejecutar, sobre la secuencia de imágenes importada en el paso 4 More>Multi Measure lo que generará un archivo con los datos crudos (u.a.f.) de cada una de las regiones de la máscara. Pegar en una hoja de datos de Origin 8.0 y guardar este archivo.

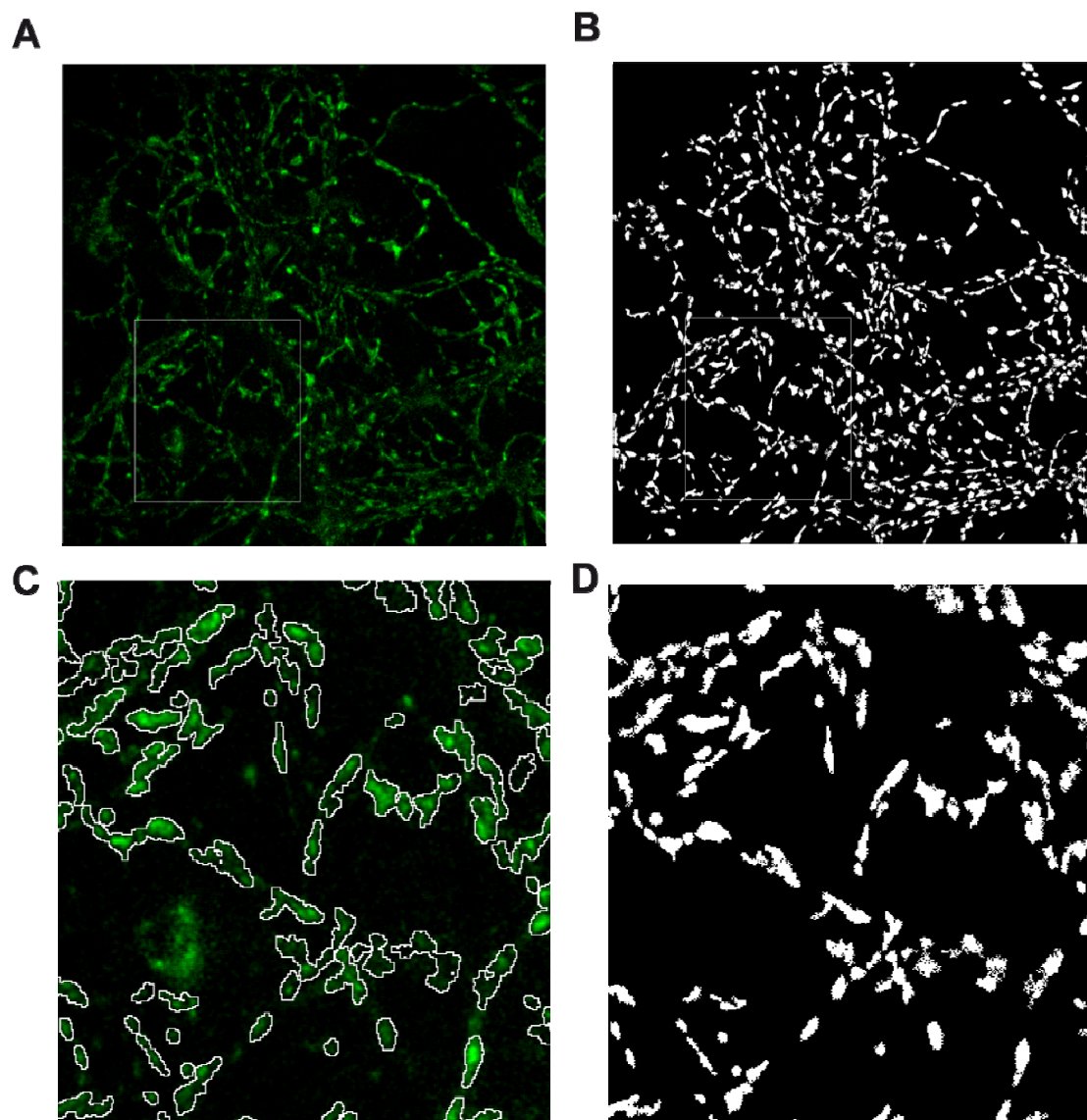


Figura 15- Campo a t0 de un experimento de FM1-43 (A) y máscara obtenida tras el análisis en IgorPro (B). Obsérvese en el detalle de C como las regiones encajan perfectamente en los puntos de fluorescencia.

6-Normalizar los datos al valor inicial de fluorescencia con Microsoft Excel y representar en Origin 8.0 para su posterior procesamiento. Los cálculos relativos a valores de fluorescencia inicial se llevaron a cabo con el dato previo a la normalización.

7-Las determinaciones llevadas a cabo sobre los datos se recogen en la figura a continuación.

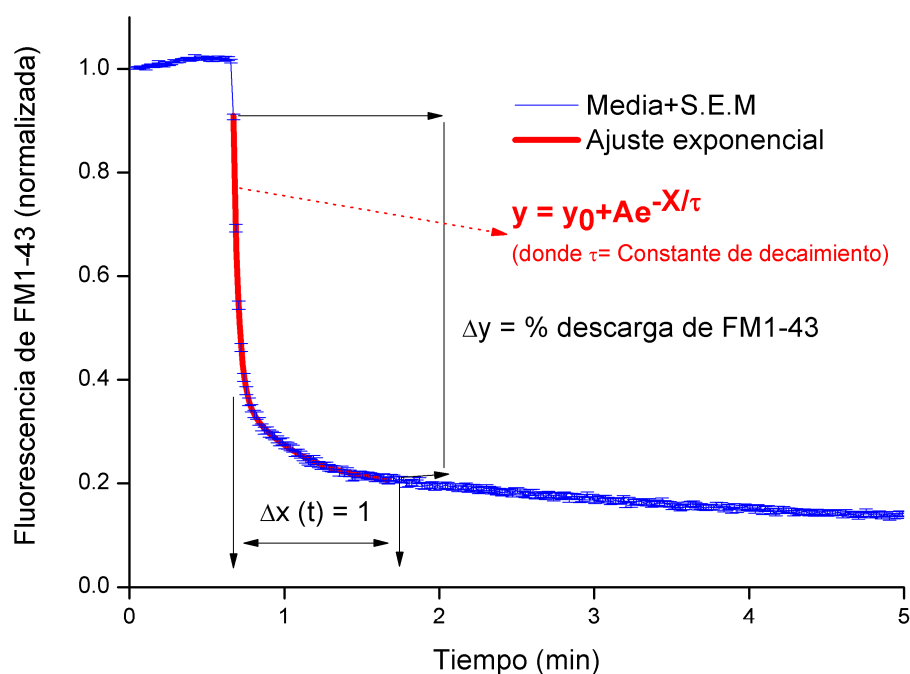


Figura 16- Ajuste a decaimiento exponencial de primer orden de la cinética de descarga y cálculo del porcentaje de liberación, ambos llevados a cabo en OriginPro 8.0.

La ventaja principal de este procesamiento es la mínima intervención del usuario y la definición automática de las regiones de interés, lo que lleva a una ausencia de pixeles

"muertos" en las regiones a analizar lo que lleva a minimizar la interferencia en los valores numéricos obtenidos.

8-Cuando se requirió, se midió la longitud total de axones presentes en el campo haciendo uso del *plug-in* "Neurite J" del programa ImageJ (Meijering *et al.*, 2004) sobre la imagen obtenida en el paso 9 del protocolo 2.5.1.2.

3.3- VGluT1-pHluorina

1-Basándonos en la imagen obtenida tras el paso 6 del protocolo en 2.5.2.2, definir a mano las regiones de interés con el programa ImageJ. Restaurar la selección en un documento en blanco de las mismas dimensiones y generar una máscara binaria (Edit>Selection>Restore Selection; Edit>Draw; Edit>Fill; Process>Binary>Make Binary). Definir también al menos dos regiones de fondo en zonas ausentes de células. Generar el ROIset (Analyze>Analyze particles y proceder como en la figura 14C), y guardar.

2-Aplicar el ROIset sobre la imagen de partida y medir: More>Multi measure. Pegar los datos crudos en un documento de Origin 8.0 (figura 17A) y proceder a la sustracción del fondo mediante la sustracción de la media de los valores de cada una de las regiones libres de células (figura 17B). Sustraer a cada región el valor de su línea base, de este modo se confiere a la línea base el valor "0" (figura 17C). Posteriormente normalizar al valor máximo de fluorescencia obtenido tras la perfusión de NH_4Cl , lo que conferirá a este punto el valor "1" (figura 17D), todas las operaciones sobre los datos crudos se

llevaron a cabo en Microsoft Excel. De este modo podemos medir nuestra señal como fracción de vesículas puestas en juego ante un estímulo determinado.

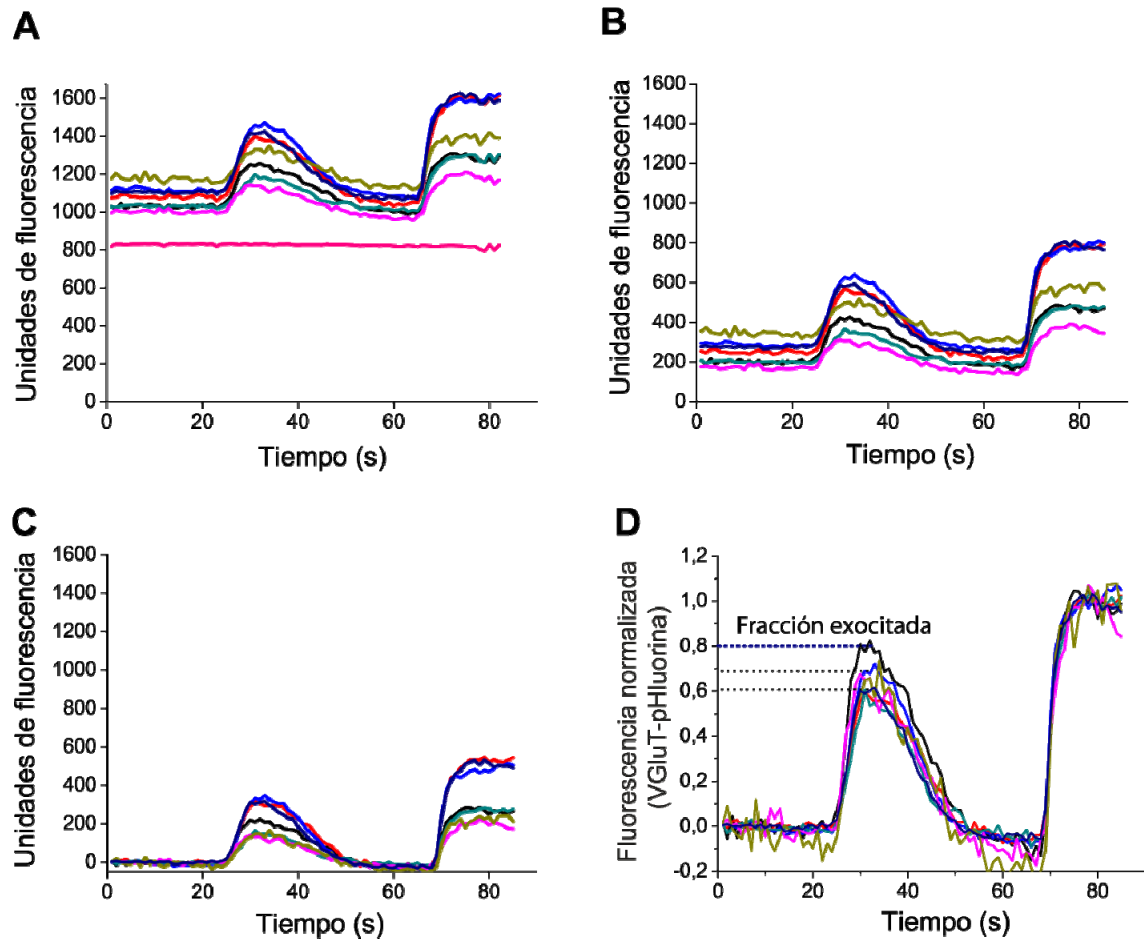


Figura 17- Procesamiento matemático de los datos crudos obtenidos en VGluT-pHluorina. A) Datos crudos y región de fondo; B) Datos con el fondo sustraído; C) Datos cuya línea base se ha ajustado a 0 y D) Datos normalizados al máximo de fluorescencia.

3- Para la caracterización del fenómeno de silenciamiento elegimos como umbral un 4% de la respuesta máxima de fluorescencia, por encontrarse los niveles de ruido en nuestro sistema cercanos a este valor.

3.4- FURA2-AM

1- Partiendo de la imagen obtenida en el paso 7 del protocolo 2.5.3.2, generar una máscara como se ha descrito previamente para FM1-43. Aplicar esta máscara sobre cada longitud de onda del experimento de imagen de calcio. Definir manualmente regiones de fondo para cada canal y sustraerlas al valor numérico de los datos haciendo uso de Microsoft Excel.

2- Obtener la señal ratiométrica de cada región por división de sus valores a 340nm entre los valores a 380nm. Normalizar a la línea base lo que le confiere a esta el valor 1 (Microsoft Excel). Representar en Origin 8.0 y analizar.

3.5- Inmunocitoquímica *post-hoc*

1-El procesamiento de FM1-43 es análogo al explicado en la sección 3.2 de este apartado. Alinear las imágenes de inmunocitoquímica de cada canal con la imagen de FM1-43 haciendo uso del *plug-in "align RGB planes"*.

2-Aplicar la máscara sobre cada imagen de inmunorreactividad y guardar los valores. Normalizar en Origin a la media de inmunorreactividad de la población total. Conferir a cada respuesta un valor de inmunorreactividad y ordenar, en grupos de inmunorreactividad, las diferentes respuestas en Origin 8.0. Este protocolo se detalla en el anexo I.

3.6- Inmunocitoquímica

1-Proceder de igual modo que en la figura 13. La imagen que debemos cargar ha de ser la imagen de inmunorreactividad deseada con el fondo sustraído. Tomar la precaución de ajustar "Baseline Starts:1; Ends:1"

2-Importar la máscara generada en ImageJ como se ha descrito previamente (Figura 14B). Aplicar esta máscara sobre las imágenes de inmunorreactividad y obtener los valores. Pegar en Origin 8.0, representar gráficos y procesar.

3.7-Microscopía electrónica

Todas las medidas se realizaron con Image J y se multiplicó por el factor correspondiente para transformar el número de píxeles en nanómetros. A 80.000x, el aumento empleado en la mayoría de los casos esta relación fue de 0,71 pixels/nm.

3.8-Estadística y ajustes

Adquisición de Imagen: Microscopía óptica: Andor IQ 1.9.1; Microscopía electrónica: Programa AnalySIS 5.0 de Olympus-SIS.

Tratamiento de imágenes; ImageJ; Adobe PhotoShop CS3. Procesamiento de experimentos de FM1-43: IgorPro 6.31, Macro: *Batch Image Process*. Medidas de longitud total de neuritas: Extensión *Neurite-J* del programa ImageJ.

Ajuste lineal ($y=a+bx$); Ajuste de decaimiento exponencial ($y=y_0+Ae^{-x/\tau}$): Origin Pro 8.0.

Test t-Student; Comparaciones múltiples ANOVA (con Bonferroni); Origin Pro 8.0.

Distribución de probabilidad acumulada: Sigma Plot (versión 11.0)

Test de Kolmogorov-Smirnov y análisis de conglomerados: Statgraphics Centurion XVI.I.

Ilustración y Maquetación: Adobe Illustrator CS3.

IV- Resultados

"La imposibilidad es fruto de tirar por la borda el afán"

Pardoxus luporum

IV-Resultados

1-Diferencias en la eficacia de reciclamiento subyacen a la heterogeneidad de respuestas sinápticas en neuronas granulares de cerebelo en cultivo

Mediante el uso de la sonda FM1-43 se puso de manifiesto que la eficacia de reciclamiento vesicular entre dos estimulaciones sucesivas de 5 minutos, espaciadas por un periodo de lavado de 10 minutos, exhibía una gran variabilidad si se analizaba el comportamiento de sinapsis individuales en redes de neuronas granulares de cerebelo en cultivo. La estimulación de la red neuronal por la perfusión de una solución hipercalémica genera un amplio repertorio de respuestas exocitóticas tanto en términos cinéticos como en términos de porcentaje de liberación (porcentaje de vesículas liberadas durante la primera estimulación que son susceptibles de ser exocitadas durante una segunda ronda de estimulación). Puesto que las células en que se analizan estas respuestas han sido sometidas a una primera ronda de estimulación, estas diferencias exocitóticas han de estar relacionadas con las diferentes eficacias de reciclamiento de las sinapsis individuales. En la figura 1A se ilustra un ejemplo de la heterogeneidad de respuestas individuales en lo que respecta a liberación vesicular en un único experimento, cuyo histograma de frecuencias queda recogido en la figura 1B. Tras llevar a cabo un análisis de conglomerados (del inglés *clúster*) y un ajuste a dos Gaussianas sobre una población con un elevado número de sinapsis individuales (Figura 1D, N=7, n=1788), constatamos la existencia de dos subpoblaciones sinápticas segregables en función de su tasa de descarga de FM1-43. Tanto por medio del análisis de conglomerados como por medio del ajuste a dos gaussianas, se estimó un valor umbral en torno al 40% de descarga y fue empleado posteriormente para segregar las respuestas individuales. Estas respuestas se clasificaron en un grupo de descarga fuerte,

cuya liberación era superior al 40% de su fluorescencia inicial y en un grupo de descarga débil, con una liberación inferior al 40% de la fluorescencia inicial (Figura 1C). A 7 Días *In Vitro* (DIV), el porcentaje relativo de la sub-población de descarga fuerte suponía un $62,6 \pm 4,9 \%$, mientras que la población de descarga débil era un $37,4 \pm 4,9 \%$ sobre el total de respuestas analizadas (Figura 1C, diagrama circular).

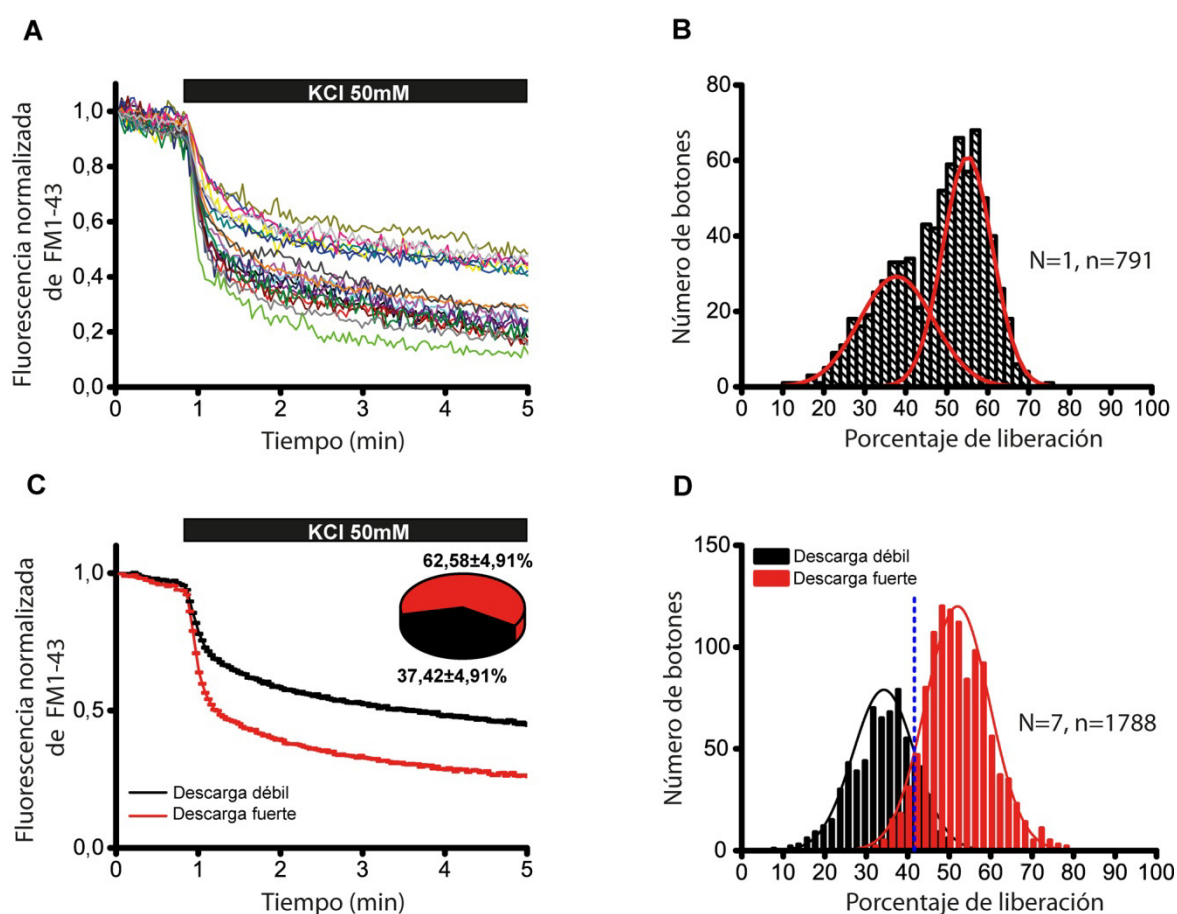


Figura 1- Se muestra la distribución bimodal de respuestas exocitóticas individuales tras la estimulación con KCl 50mM (A) y el ajuste de un experimento individual a dos gaussianas (n=791) (B). El mismo procedimiento se llevó a cabo para una metapoblación de sinapsis (N=7, n=1788) (C) y se observó una distribución de frecuencias equivalente tras ajustar a dos gaussianas (D), el punto de corte entre las gaussianas (40% de descarga) fue empleado *a posteriori* para segregar los dos tipos de respuestas observadas.

Una vez caracterizadas las dos sub-poblaciones de respuestas, decidimos estudiar otros parámetros distintos al empleado para la segregación de estas que pudiesen guardar relación con la eficacia de reciclamiento. Se analizaron las fluorescencias iniciales, parámetro directamente proporcional al número de vesículas que han experimentado un proceso de reciclamiento (exo/endocitosis) durante la fase de carga con la sonda FM1-43, y las constantes temporales (τ) de exocitosis, tras llevar a cabo un ajuste a un decaimiento exponencial de primer orden ($y=y_0+Ae^{-X/\tau}$) sobre los datos cinéticos. Se observó que las menores eficacias de reciclamiento estaban siempre relacionadas con valores mayores de fluorescencia inicial, lo que pone de manifiesto que el contenido vesicular marcado en estas sinapsis durante la estimulación es mayor (Figuras 2A y 2B; Fl. inicial grupo de descarga fuerte = $14,1 \pm 0,2$, N=3, n=896 // Fl. inicial grupo de descarga débil = $19,2 \pm 0,4$, N=3, n=463; ANOVA $p<0.01$; K-S Test $p<0.01$). También se encontraron diferencias significativas en lo que respecta a las constantes temporales de exocitosis, siendo estas menores en el grupo de mayor tasa de liberación, lo que refleja que estas sinapsis son capaces de movilizar y exocitar su contenido vesicular de forma más rápida que las sinapsis del grupo de descarga débil (Figura, 2C y 2D; τ grupo fuerte = $11,4 \pm 0,4$ "; $\chi^2 = 5,63 \times 10^{-4}$ // τ grupo débil = $15,4 \pm 0,7$ "; $\chi^2 = 5,64 \times 10^{-4}$). Al llevar a cabo un ajuste exponencial de segundo orden sobre las cinéticas de exocitosis ($y=y_0+A_1e^{-X/\tau_1} + A_2e^{-X/\tau_2}$), se corroboró que las cinéticas de descarga seguía un patrón bifásico, lo que es coherente con lo previamente descrito por otros grupos de investigación (Klingauf *et al.*, 1998; Mozhayeva *et al.*, 2002). Las constantes temporales de estas dos componentes de liberación fueron las siguientes: τ_1 grupo de descarga fuerte = $9,6 \pm 0,6$ s; τ_2 grupo de descarga fuerte = $91,2 \pm 11,4$ s; $\chi^2 = 1,05 \times 10^{-4}$ // τ_1 grupo de descarga débil = $16,8 \pm 3,0$ s; τ_2 grupo de descarga débil = $113 \pm$

23,4 s; $\chi^2 = 1,99 \times 10^{-4}$, constatándose de nuevo la menor velocidad de exocitosis del grupo de descarga débil en ambos componentes de la descarga. En cualquier caso se observó que ambos grupos de sinapsis poseían un componente rápido de liberación de vesículas ante la llegada de la estimulación. Puesto que la incorporación inicial de sonda fue inducida mediante un protocolo que afecta de forma homogénea a todas las sinapsis presentes en un campo, las diferencias exocitóticas observadas son exclusivamente atribuibles a la heterogeneidad en la eficacia de reciclamiento.

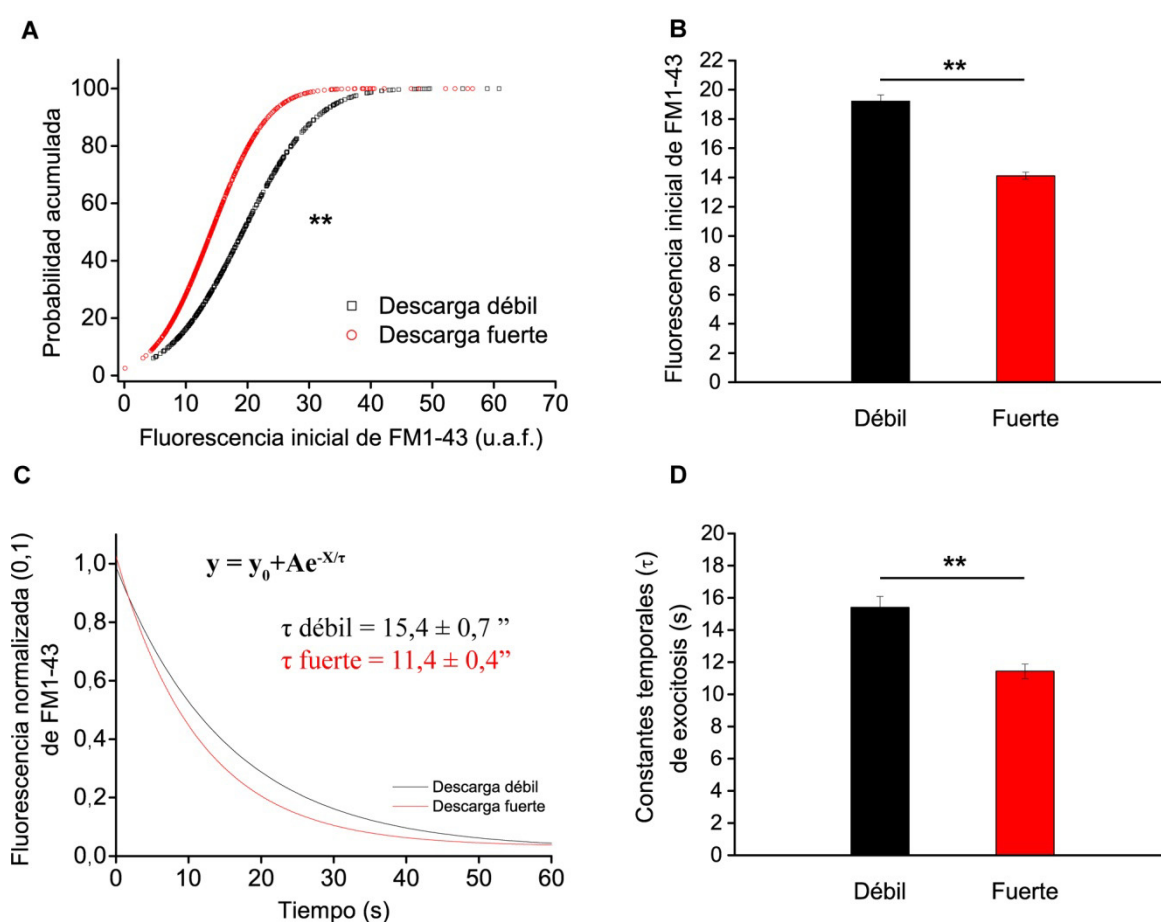


Figura 2- Distribución de probabilidad acumulada de las fluorescencias iniciales de cada tipo de sinapsis (A) y comparación de medias (B). El ajuste cinético de las respuestas medias de cada uno de los grupos se muestra en (C) y la comparación de las constantes de decaimiento promediadas promedio se muestra en (D). (** $p < 0,01$ K-S Test en A; ANOVA con Bonferroni en B y D)

Para descartar un posible efecto de la exocitosis espontánea que tiene lugar durante el tiempo de lavado de la sonda (10 minutos en condiciones control) sobre la eficacia de reciclamiento, se diseñó una serie de experimentos consistentes en variar los tiempos de lavado, tras el periodo de carga con FM1-43. Además, se analizó el efecto del calcio extracelular en la solución de lavado (0 mM o 1,33 mM).

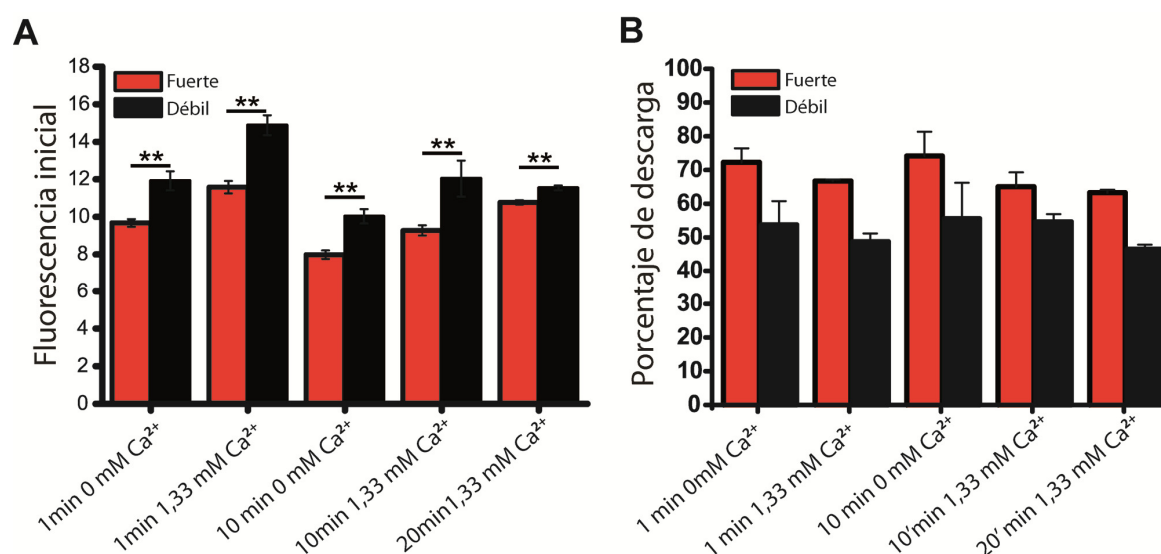


Figura 3- Fluorescencias iniciales (A) y porcentajes de descarga (B) de cada uno de los grupos a distintos tiempos de lavado en distintas concentraciones de calcio (**p<0,01, Prueba t de Student; en B no se muestra significación por haber sido ambos grupos segregados manualmente imponiéndose un umbral arbitrario).

No se encontraron diferencias entre los porcentajes de botones pertenecientes a cada grupo en las distintas condiciones, ni entre los porcentajes de descarga de cada uno de los grupos (Figura 3B) encontrándose únicamente diferencias significativas en las fluorescencias iniciales entre los grupos con distintos tiempos de lavado, pero manteniéndose las diferencias relativas entre grupos en una misma condición de lavado

(Figura 3A), lo que indicaba que una mayor tasa de exocitosis espontánea en los botones de descarga fuerte no era la responsable de las diferencias cinéticas observadas. El efecto del calcio sólo fue apreciable en los botones de baja eficacia de reciclamiento en tiempos cortos de lavado, si bien es cierto que fue el contrario al esperado, pues se relacionó con una mayor fluorescencia inicial (Figura 3B). Debido a que no se encontraron diferencias significativas al emplear distintos tiempos de lavado ni distintas concentraciones de calcio, las condiciones de lavado escogidas para el resto de experimentos fueron de 10 minutos en ausencia de calcio extracelular.

2- La magnitud del evento exocitótico determina la eficacia de reciclamiento

Nuestro siguiente objetivo fue analizar en qué medida, las diferencias en la eficacia de reciclamiento estaban relacionadas con la magnitud del estímulo exocitótico que desencadenó la incorporación de la sonda FM1-43 en el interior de las vesículas sinápticas. Para ello llevamos a cabo una serie de experimentos a distintas concentraciones de calcio extracelular (desde 0,25 hasta 1,33 mM) con objeto de disminuir el número de vesículas exocitadas durante la fase de carga. Se observó una reducción dramática del porcentaje de botones que exhibían un reciclamiento poco eficaz al emplear bajas concentraciones de calcio durante la fase de carga (Figuras 4A, 4B y 4C diagramas circulares; $40,1 \pm 6,3\%$ a 1,33mM CaCl_2 ; $25,9 \pm 10\%$ a 0,5mM CaCl_2 [$p>0,05$]; $12,5 \pm 3,9\%$ a 0,25mM CaCl_2 [$p<0,01$]; ANOVA), este aumento de la eficacia de reciclamiento no estaba acompañado por una disminución en la densidad de botones por unidad de longitud (Figura 4F $0,055 \pm 0,01$ a 1,33 mM CaCl_2 ; $0,075 \pm 0,002$ a 0,5 mM CaCl_2 ; $0,055 \pm 0,010$ a 0,25 mM CaCl_2 expresado en sinapsis/ μm ; $p>0,05$, ANOVA) y por tanto indicaba un cambio en la eficacia de reciclamiento

vesicular inversamente proporcional a las intensidades de estimulación. Además del aumento en el porcentaje de sinapsis cuya eficacia de reciclamiento era mayor, se observó un aumento del porcentaje de liberación en ambos grupos de descarga, lo que guarda relación con un aumento global de la eficacia de reciclamiento al emplear menores intensidades de estimulación (Figuras 4A-C, 4E y 4F Grupo de descarga fuerte 1,33mM=54,98±0,35%, N=3, n=623; 0,50mM=56,67±0,32%, N=4, n=1045 [$p<0,01$]; 0,25mM= 64,17±0,31%, N=4, n=1040 [$p<0,01$] // Grupo de descarga débil 1,33mM=36,10±0,34%, N=3, n=586; 0,50mM = 35,38±0,41%, N=4, n=361 [$p>0,05$]; 0,25mM=41,08±0,72%, N=4, n=148 [$p<0,01$], comparado a la condición control, ANOVA). Por tanto el mecanismo que limitaba la eficacia de reciclamiento no se manifestaba al emplear bajas concentraciones de calcio durante la fase de carga.

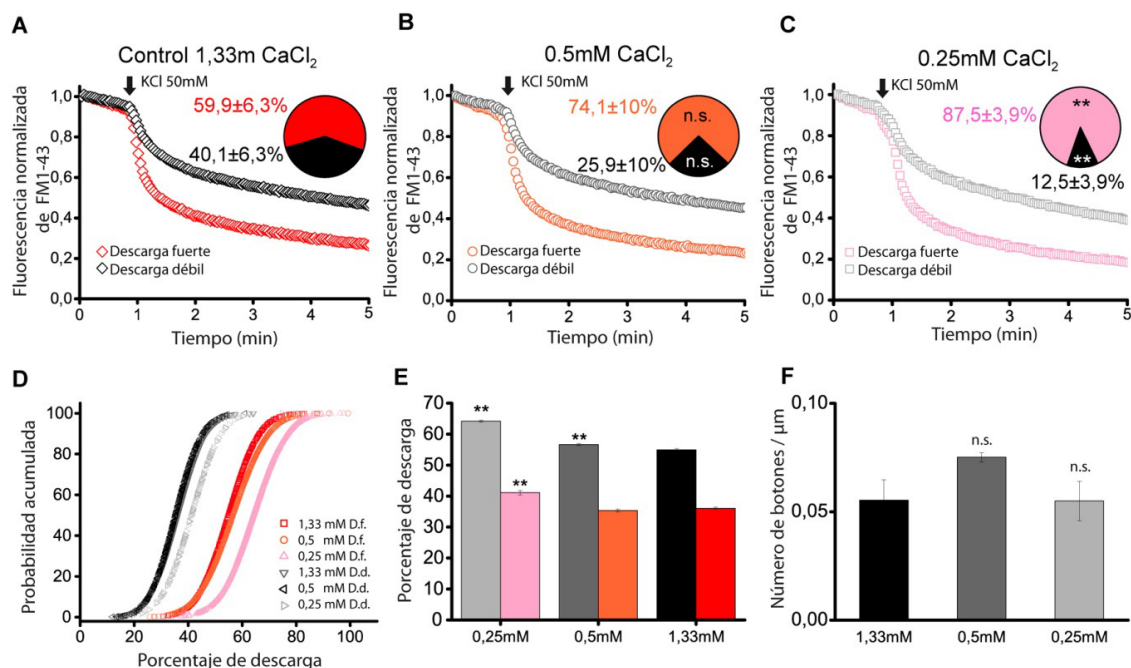


Figura 4- Patrones de descarga y porcentaje relativo de cada tipo de botones (diagramas circulares) a 1,33mM Calcio (A); 0,5mM Calcio (B) y 0,25mM Calcio (C) durante la fase de carga con FM1-43. Distribución de probabilidad acumulada de los porcentajes de descarga (D) y valor medio (E) para cada una de las subpoblaciones a distintas concentraciones de calcio extracelular durante el periodo de carga. (F) Densidad de botones sinápticos (n° de botones/μm) ** $p<0,01$; ANOVA con Bonferroni.

3- Bajas concentraciones de FM1-43 marcan selectivamente las vías de reciclamiento ineficaz

Se han descrito diferencias en lo referente a la hidrofobicidad relativa de las membranas recaptadas tras la estimulación en las distintas formas de endocitosis (Clayton y Cousin, 2008). Con el objetivo de averiguar si las formas de reciclamiento ineficaz estaban asociadas a estas vías de endocitosis, decidimos llevar a cabo una aproximación consistente en la disminución de los niveles de sonda FM1-43 durante el periodo de carga, asumiendo que la disminución de las concentraciones de sonda daría lugar a una incorporación selectiva de la sonda en membranas más hidrofóbicas. La disminución de los niveles de sonda produjo un cambio dramático en los porcentajes relativos de cada uno de los tipos de botones, aumentando el porcentaje de aquellos que mostraban una baja eficacia de reciclamiento vesicular (Figura 5A; $26,1 \pm 7,6$ % a $10\mu\text{M}$ de FM1-43; $72,1 \pm 3,9$ % a $5\mu\text{M}$ de FM1-43 [$p > 0,01$] y $89,7 \pm 6,1$ a $3\mu\text{M}$ de FM1-43 [$p < 0,01$]) así como una disminución de la fracción de fluorescencia liberada en ambos tipos de sinapsis (Figura 5B; $59,7 \pm 0,2$ % y $39,2 \pm 0,1$ % a $10\mu\text{M}$ FM1-43; $53,0 \pm 0,7$ % y $36,9 \pm 0,53$ % a $5\mu\text{M}$ FM1-43 [$p < 0,001$] y $47,5 \pm 1,8$ % y $29,6 \pm 0,6$ % a $3\mu\text{M}$ FM1-43 [$P < 0,001$] ANOVA frente al control). Esta reducción de la eficacia de reciclamiento se vio acompañada de una reducción de la densidad de botones (Figura 5C; $0,054 \pm 0,01$ a $10\mu\text{M}$ FM1-43; $0,020 \pm 0,002$ a $5\mu\text{M}$ FM1-43 [$p < 0,05$] y $0,014 \pm 0,0019$ a $3\mu\text{M}$ FM1-43, [$p < 0,05$], ANOVA), lo que indica que a diferencia de la modificación de las concentraciones de calcio, la modificación de las concentraciones de sonda no generaba un cambio en la eficacia de reciclamiento de los botones, sino que más bien marcaba preferentemente aquella subpoblación de botones con una baja eficacia de reciclamiento, lo que quedó reflejado en un cambio virtual del comportamiento cinético

de las sinapsis estudiadas y en una disminución del número de botones en la unidad de longitud.

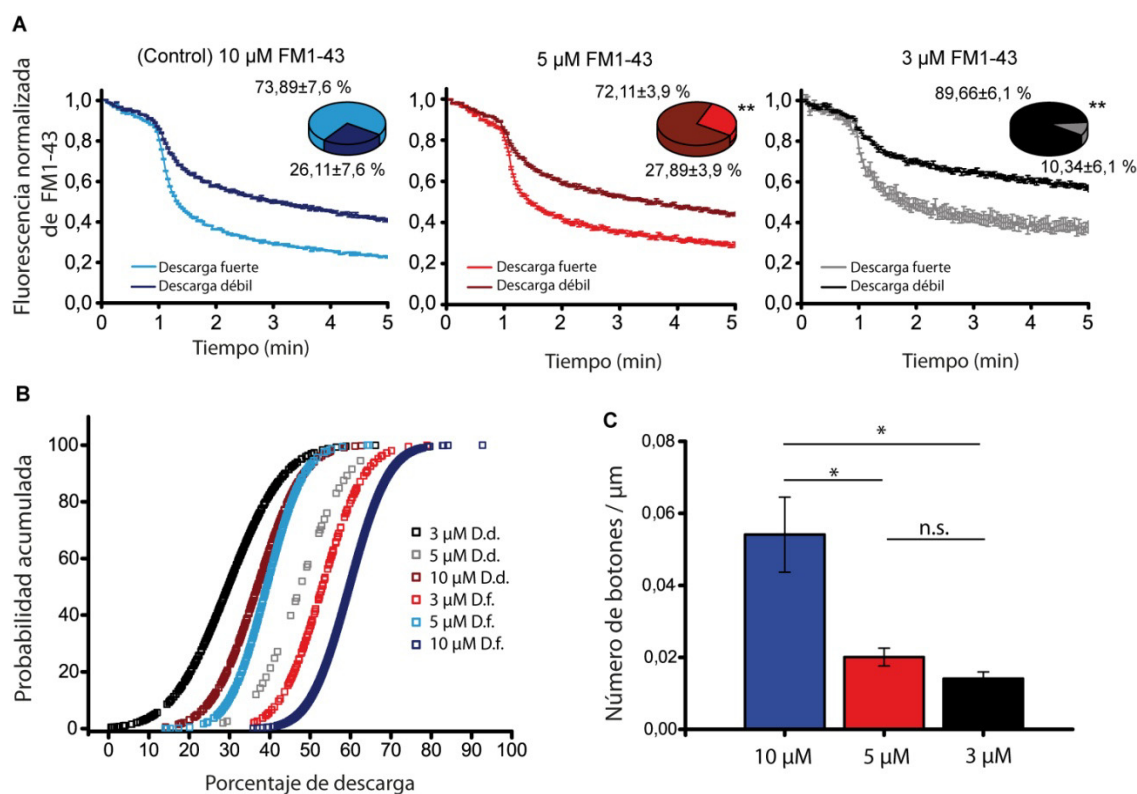


Figura 5- A) Se ilustran los patrones de descarga, así como los porcentajes relativos (diagramas circulares) de cada uno de los grupos de respuesta a 10 μ M (Azul), 5 μ M (Rojo) y 3 μ M (Negro) de FM1-43 durante la fase de incorporación de la sonda en las vesículas sinápticas. (B) Gráfico de probabilidad acumulada de descarga de los distintos grupos a diferentes concentraciones de sonda. (C) porcentaje de botones por μ m de fibra axónica al emplear diferentes concentraciones de sonda durante la carga. El código de colores empleado en 5B y 5C es el mismo que en la figura 5A.

4-El reciclamiento ineficaz de las vesículas sinápticas está asociado a formas lentas de endocitosis

Las diferente susceptibilidad al marcaje de los distintos grupos de botones sinápticos al emplear concentraciones decrecientes de FM1-43 puede explicarse por tres motivos principalmente: i) una mayor hidrofobicidad de las membranas endocitadas en estos terminales; ii) una mayor superficie de membrana de los orgánulos endocitados en este tipo de terminales tras la estimulación y iii) una menor velocidad de cierre de poro y fisión de las vesículas u orgánulos endocitados en este tipo de terminales, lo que favorecería la unión de la sonda, a bajas concentraciones, a aquellas membranas que estén más tiempo expuestas a la solución extracelular. Para dilucidar cuál de estos factores contribuía mayoritariamente a las diferencias cinéticas observadas a bajas concentraciones de sonda, diseñamos un experimento en el que la sonda no estaba presente en la solución de estimulación, de manera que solo aquellas formas de endocitosis que persistieran después de la estimulación pudiesen incorporar sonda en el lumen de los orgánulos endocitados; a este protocolo se le denominó protocolo de carga asincrónica de FM1-43. Se encontraron diferencias en el porcentaje relativo de cada uno de los tipos de botones, produciéndose una inversión de los porcentajes típicos de las condiciones control, lo que se manifestó en un aumento drástico del porcentaje de botones con patrón de descarga débil (Figura 6A; Descarga débil: $38,5 \pm 4,8\%$ en control; $76,9 \pm 6,0$ en carga asincrónica; $p < 0,01$, Prueba de t de Student). Además se vio reducido el número de botones marcados en la unidad de longitud (Figura 6C, Control: $0,047 \pm 0,003$ botones/ μm ; Asincrónica: $0,031 \pm 0,005$ botones/ μm ; $p < 0,01$ Prueba t de Student), lo que, al igual que al emplear concentraciones decrecientes de sonda, está indicando una diferencia en el número de botones que exhibe mecanismos endocitóticos

asociados a un reciclamiento vesicular ineficaz, pero no un cambio en el comportamiento exo/endocitótico de los botones presentes en la preparación.

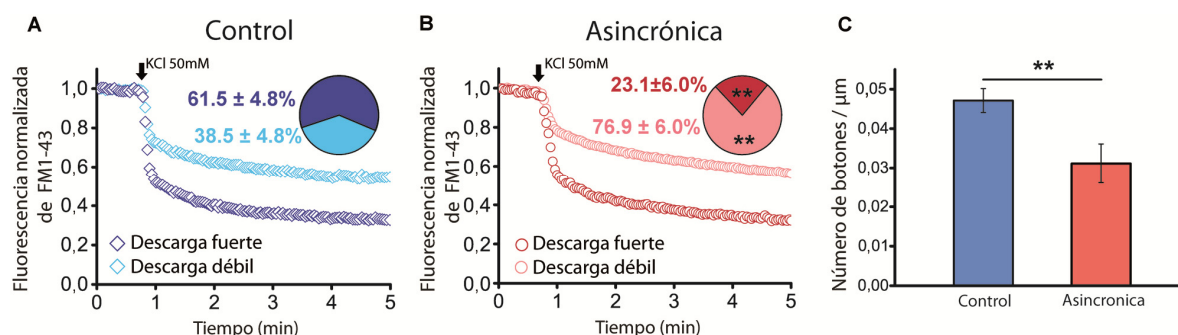


Figura 6- Patrón de descarga y porcentajes relativos de cada uno de los grupos en las distintas condiciones de carga con FM1-43. En (A) se muestran las condiciones de carga control y en (B) el patrón de descarga tras la carga asincrónica con FM1-43. En (C) se indican la densidad de botones por unidad de longitud (** $p < 0,01$, Prueba t de Student).

5-Papel de la dinamina en las distintas formas de reciclamiento vesicular

La endocitosis compensatoria de las vesículas sinápticas que tiene lugar gracias al reciclamiento mediado por clatrina es completamente dependiente de la enzima dinamina. En nuestra preparación, la inhibición de la actividad de esta enzima por la incubación (previa a la carga con FM1-43) con el inhibidor selectivo de su actividad GTPasa, el dynasore (20 μM , 30 min.) (Macia *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2006), no dio lugar a una ausencia de incorporación de sonda en los terminales analizados, al emplear concentraciones fisiológicas de calcio durante el periodo de carga (1,33mM), indicando que había formas de reciclamiento coexistentes con la endocitosis mediada por clatrina en una subpoblación de terminales sinápticos. Al llevar a cabo este mismo tipo de experimentos a bajas concentraciones de calcio durante la fase de carga con FM1-43 (0,25mM), encontramos una ausencia total de incorporación de FM1-43 en los

terminales estudiados, lo que indicaba que la estimulación en presencia de distintas concentraciones de calcio activaba distintas formas de endocitosis sináptica, diferencialmente acopladas al reciclamiento eficiente de vesículas sinápticas, como se muestra en la figura 7, y con distinta dependencia de la actividad GTPasa de la dinamina (Figuras 7A y 7B). Estas diferencias endocitóticas se manifestaron al analizar las fluorescencias iniciales de aquellas zonas de los axones que habían incorporado FM1-43 en ambas condiciones, lo que quedó reflejado tanto en el valor medio, como en la distribución de probabilidad acumulada de estas fluorescencias (Figuras 7C y 7D; Dynasore 0,25 mM Calcio: $2,22 \pm 0,11$ u.a.f. de FM1-43, N=5, n=86; Dynasore 1,33 mM Calcio: $5,42 \pm 0,55$ u.a.f. de FM1-43, N=4, n=111; [$p < 0,01$] ANOVA y K-S test). Además se observó un cambio en la distribución de probabilidad acumulada de las fluorescencias iniciales al emplear distintas concentraciones de calcio durante la carga en condiciones control (sin interferir con la actividad GTPasa de la enzima) (Figura 7C y 7D Control 0,25 mM Calcio: $14,76 \pm 0,30$ u.a.f. de FM1-43, N=3, n=488; Control 1,33mM Calcio: $19,42 \pm 0,49$ u.a.f. de FM1-43, N=3, n=615; [$p < 0,01$] ANOVA y K-S test). También encontramos deficiencias en la eficacia de reciclamiento exhibida por aquellos terminales que habían incorporado sonda a concentraciones fisiológicas de calcio de forma dinamina-independiente, ya que estos terminales no mostraron ningún tipo de respuesta exocitótica en una segunda ronda de despolarización sostenida, como demuestra su paralelismo con una cinética obtenida al realizar un experimento en presencia del quelante de calcio EGTA (100 μ M) en presencia de 50 μ M CaCl₂. Además, esta deficiencia de reciclamiento manifestada en una ausencia de exocitosis durante una segunda ronda de estimulación, quedó reflejada en un descenso dramático del porcentaje de liberación de FM1-43 en aquellos terminales que habían incorporado sonda en presencia de Dynasore (Control 1,33 mM Calcio: $48,82 \pm 1,00$ %; Dynasore

1,33mM Calcio: $11,31 \pm 1,01$ %; [$p < 0,01$] ANOVA). Estos resultados ponen de manifiesto que las formas de endocitosis asociadas a un reciclamiento eficiente de las vesículas sinápticas son dependientes de la actividad GTPasa de la dinamina, mientras que aquellas vías de recuperación de membrana dinamina-independientes no generan vesículas susceptibles de ser liberadas en una segunda ronda de estimulación (Figura 7E y 7F). Para caracterizar en detalle la independencia de la dinamina de las rutas de endocitosis que acompañan al reciclamiento ineficaz, se hizo uso de un inhibidor de la enzima cuyo mecanismo de acción no es la inhibición del centro activo de esta (actividad GTPasa) si no la unión a su dominio PH, interfiriendo de este modo en el posicionamiento de la enzima en la membrana, por competir con la fosfatidil serina en la unión a dicho dominio. Este compuesto recibe el nombre de MiTMAB (del inglés *Myristyl TriMethyl Ammonium Bromide*) (Quan *et al.*, 2007). La incubación con este compuesto fue previa al periodo de carga ($5\mu\text{M}$, 10 min.). De forma inesperada, se observó una ausencia total de endocitosis compensatoria tras el uso de MiTMAB (Figura 8A), lo que impidió por tanto el análisis de la posterior respuesta exocitótica (Figura 8B). Este hecho se vio reflejado en una disminución drástica de los valores de fluorescencia inicial de FM1-43 (Figura 8C y 8D; Control: $44,45 \pm 0,79$ u.a.f. de FM1-43, $N=2$, $n=1702$; MiTMAB: $13,14 \pm 0,52$ u.a.f. de FM1-43, $N=3$, $n=377$; $p < 0,01$, ANOVA) en posibles regiones sinápticas y en una disminución de la relación señal/ruido, que impidió el análisis posterior de respuestas exocitóticas. Las diferencias observadas al emplear dos tipos de inhibidores de la dinamina son atribuibles a los distintos mecanismos de acción de estos compuestos: mientras que la actividad GTPasa de la dinamina no parece crucial para mediar la internalización de FM1-43 asociada a reciclamiento ineficiente tras la estimulación a concentraciones fisiológicas de calcio, su localización en membrana parece indispensable para ambas formas de reciclamiento.

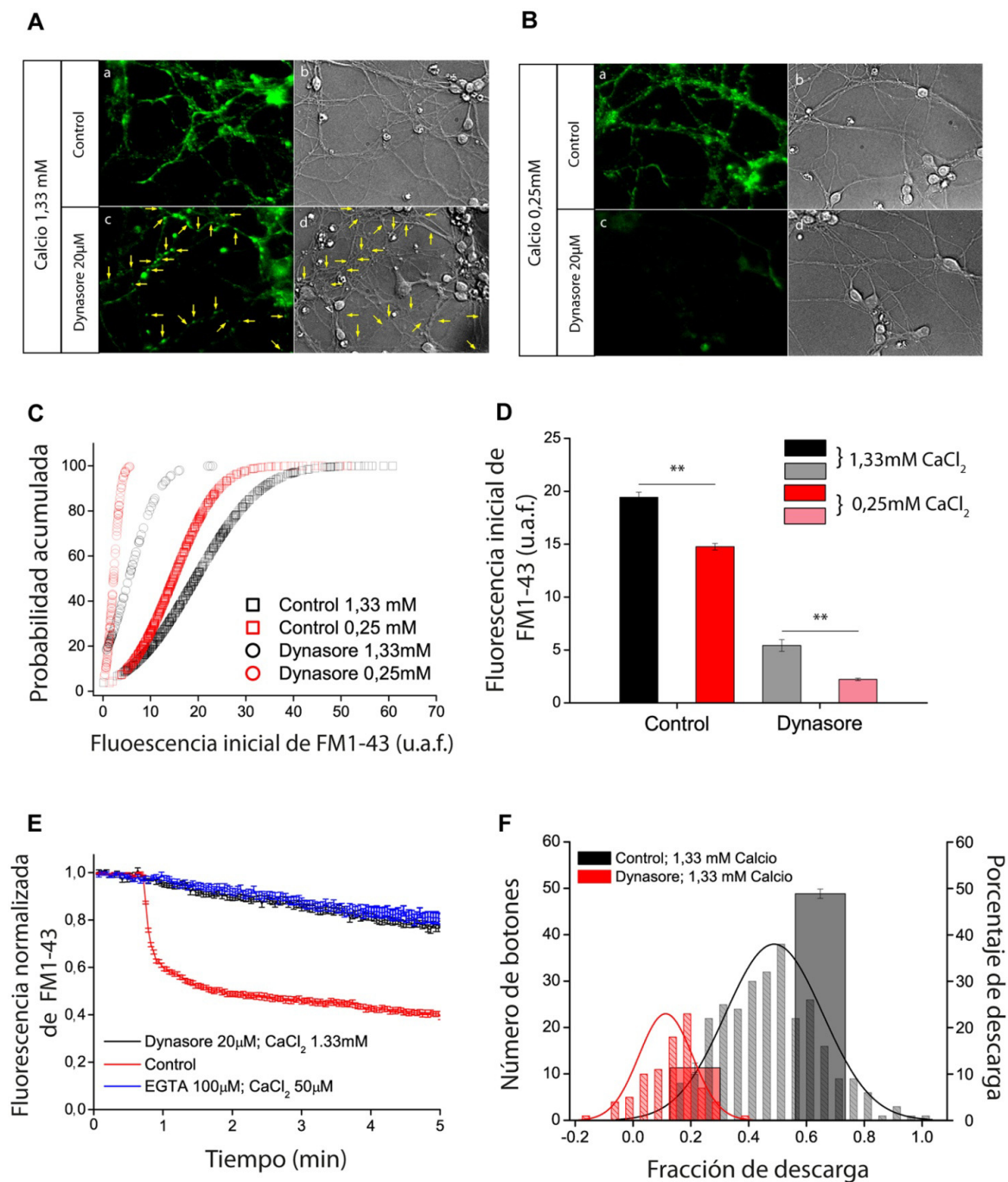


Figura 7- Efecto de la inhibición de la actividad GTPasa de la dinamina sobre la eficacia de reciclamiento. En A y B se compara el aspecto de marcaje con FM1-43 a distintas concentraciones de calcio y en presencia o ausencia de Dynasore. En C se comparan las distribuciones fluorescencias iniciales de los botones en ausencia y presencia de Dynasore a distintas concentraciones de calcio, valores promedio en D. E) Ausencia de reciclamiento (por ausencia de exocitosis) de los botones que han internalizado FM1-43 durante una estimulación con calcio 1,33 mM en presencia de Dynasore; F) Distribución de los porcentajes de descarga histogramas) y valores promedio (columnas) de los botones que habían internalizado FM1-43 en ausencia (negro) o presencia (rojo) de dynasore (**, $p < 0,01$; K-S test en C; ANOVA con Bonferroni en E).

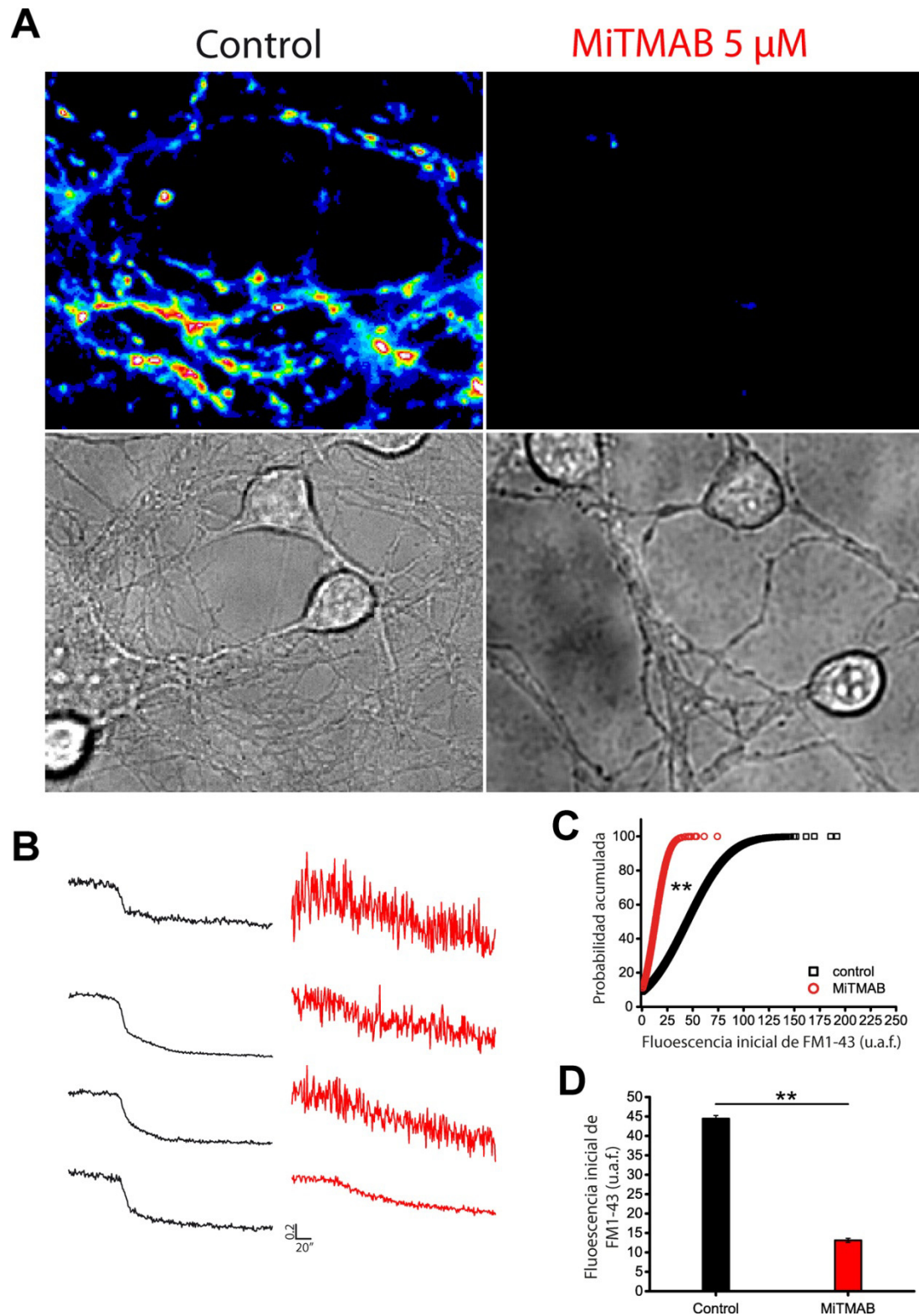


Figura 8- A) Efecto del MiTMAB sobre la incorporación de FM1-43. B) El aumento de la relación señal-ruido impidió la normalización y por tanto el análisis de las respuestas exocitóticas. C) Distribución de probabilidad acumulada y medias (D) de las fluorescencias iniciales de FM1-43(** $p < 0,01$; K-S test en C y ANOVA con Bonferroni en D).

6- Contribución diferencial de la calcineurina a las distintas formas de reciclamiento

La calcineurina ha sido propuesta como la enzima responsable de acoplar la endocitosis compensatoria a la entrada de calcio en el terminal presináptico, actuando como sensor de calcio gracias a su activación calmodulina-dependiente y promoviendo la desfosforilación de determinadas proteínas que experimentan ciclos de fosforilación/desfosforilación paralelos a los cambios en las concentraciones de calcio que acontecen en el terminal presináptico. Estas desfosforilaciones parecen ser requeridas para las interacciones que han de establecerse entre los distintos factores endocitóticos (Cousin y Robinson, 2001; Wu *et al.*, 2009; Saheki y De Camilli, 2012). Para evaluar en qué medida la actividad de la calcineurina estaba implicada en las distintas formas de endocitosis de las SVs observadas en este estudio, decidimos llevar a cabo un ensayo en presencia de FK-506 (Ochiai *et al.*, 1987), un inmunosupresor que al unirse a su inmunofilina, FK-506-BP (del inglés, FK-506 *Binding Protein*), tiene un efecto inhibitor de la calcineurina (Liu *et al.*, 1991). Al incubar con FK-506 1 μ M durante los 30 minutos previos a la carga y durante la carga con FM1-43, encontramos un marcado desplazamiento hacia las formas ineficaces de reciclamiento, lo que quedo reflejado tanto en el porcentaje relativo de grupos de botones (Figura 9A y 9B; Control, descarga fuerte: $71,56 \pm 7,81\%$; FK-506, descarga fuerte: $24,43 \pm 2,77\%$ // Control descarga débil: $28,44 \pm 7,81\%$; FK-506, descarga débil: $75,57 \pm 2,77\%$; $p < 0,01$ Prueba t de Student; Control, N=4, n=882; FK-506, N=6, n=993) como en la cinética media de descarga durante una segunda ronda de estimulación (Figura 9C). Además, se comprobó que la densidad de botones en estas condiciones era equiparable a la encontrada en las condiciones control (Figura 9D; Control: $0,045 \pm 0,003$ botones/ μ m; FK-506: $0,039 \pm 0,002$ botones/ μ m; $p > 0,05$, Prueba t de Student) , lo que nos permitió concluir

que la inhibición de la calcineurina generaba un cambio en el comportamiento endocitótico de la totalidad de los botones, sin producir una disminución en el número de botones totales marcados por la sonda. Además, las formas de endocitosis asociadas con un reciclamiento eficaz de las vesículas sinápticas (presumiblemente endocitosis mediada por clatrina) parecen más sensibles a la inhibición farmacológica de la enzima calcineurina.

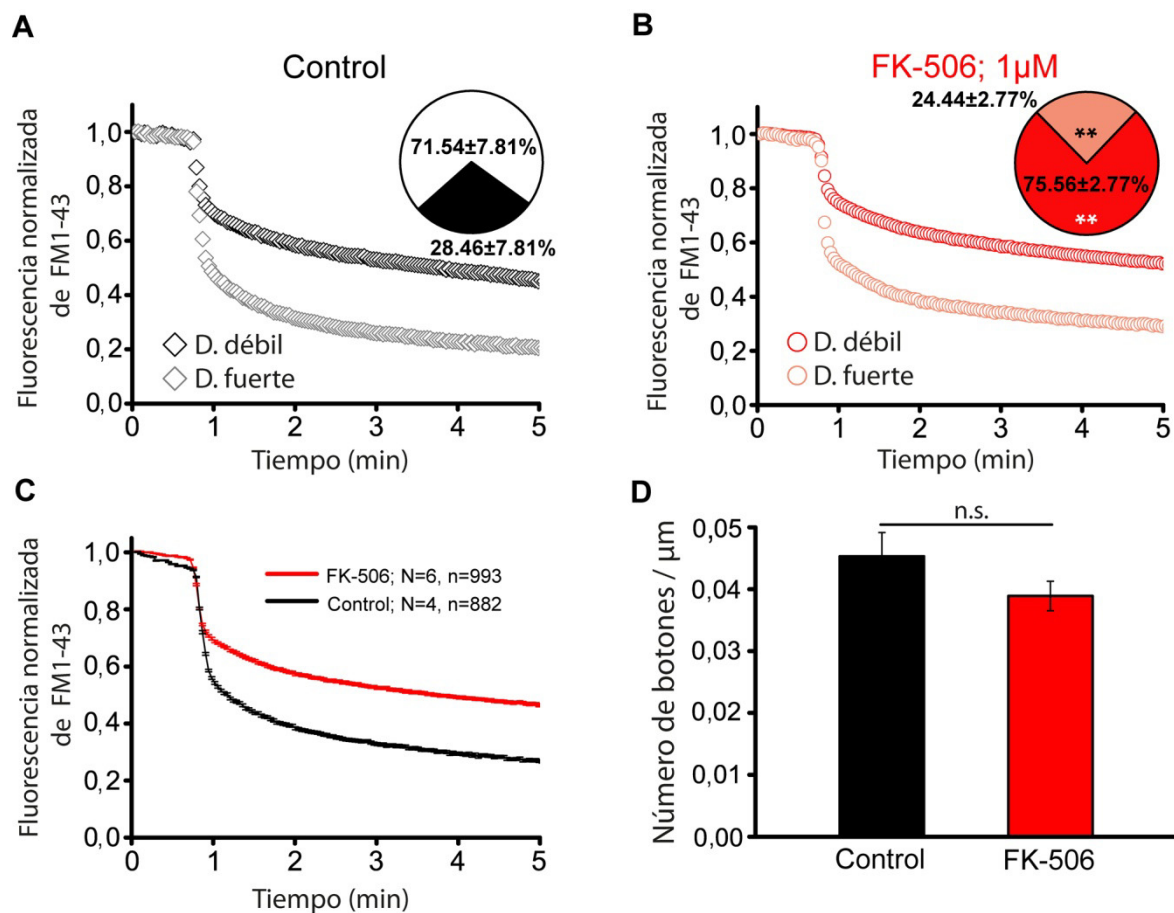


Figura 9- Comparación de las cinéticas de descarga y de los porcentajes relativos de los grupos de botones en condiciones control (A) y tras la inhibición farmacológica de la calcineurina con FK-506 (B). En C se muestran las cinéticas promedio de descarga en las distintas condiciones, la menor eficacia de reciclamiento tras la inhibición de la calcineurina con FK-506 se manifestó en un porcentaje de liberación menor durante la segunda ronda de estimulación. En D se muestran las densidades de botones marcados con FM1-43 en ambas condiciones. (** $p < 0,01$; n.s. no significativo; prueba t de Student)

7- El fenómeno de "Kiss&Run" no está implicado en las formas ineficaces de reciclamiento

Los experimentos realizados en presencia de MiTMAB y Dynasore pusieron de manifiesto que determinadas formas de endocitosis independientes de la acción GTPasa de la dinamina, desencadenadas ante estimulaciones persistentes a concentraciones fisiológicas de calcio, eran en parte responsables del reciclamiento ineficiente de vesículas sinápticas. Por otra parte, se ha descrito que la estimulación neuronal a elevadas frecuencias pone en marcha mecanismos de "kiss & run" (Ales *et al.*, 1999; Stevens y Williams, 2000; Park *et al.*, 2012). Estos mecanismos se descubrieron en el año 2000 (Stevens y Williams, 2000) y se caracterizan porque a pesar de registrarse una respuesta postsináptica normal, al emplear sondas estirílicas, era imposible detectar una caída de fluorescencia atribuible a la exocitosis presináptica (o internalización de la sonda por el mismo motivo). Se ha descrito que el azul de bromofenol 2mM (BPB, por sus siglas en inglés, *BromoPhenol Blue*), por sus características espectrales, actúa como una molécula capaz de absorber la fluorescencia emitida por la sonda FM1-43, lo que permite detectar la exocitosis atribuible al fenómeno de "kiss&run" mediante FM1-43 (Harata *et al.*, 2006), ya que a pesar de que el poro de fusión que se origina durante el "kiss&run" no permite la salida de la sonda, dado que la molécula de BPB es del mismo tamaño que la de un neurotransmisor, este sí puede entrar en el lumen de las vesículas, originando allí un apagamiento de la fluorescencia remanente de FM1-43. Corroboramos un aumento de la tasa de descarga, tanto del valor medio como de la distribución de la población (Control = $44,73 \pm 0,34$, N=4, n=1288; BPB = $57,63 \pm 0,28$, N=5, n=1353; $p < 0,01$; ANOVA, K-S test), así como una inversión marcada de los porcentajes relativos de cada uno de los grupos de descarga (Control Descarga débil: $41,66 \pm 3,25\%$; BPB Descarga débil: $11,08 \pm 5,73\%$, $p < 0,01$ Prueba t de Student). Sin

embargo, no se encontraron diferencias cinéticas significativas entre los distintos grupos para sus constantes temporales de decaimiento, lo que indica que la velocidad de la exocitosis no se vio modificada al emplear BPB durante la estimulación (Descarga fuerte control = $17,4 \pm 1,3$ s// Descarga fuerte BPB = $17,97 \pm 1,46$ s; Descarga débil control = $21,56 \pm 1,29$ s// Descarga débil BPB = $24,19 \pm 1,73$ s, $p > 0,05$, ANOVA). Al analizar las fluorescencias iniciales de cada uno de los grupos en las distintas condiciones (ha de tenerse en cuenta que el BPB comienza a ser perfundido antes del inicio del experimento) se constató una disminución de la fluorescencia inicial de los botones clasificados como de descarga débil y una ausencia de efecto sobre las fluorescencias iniciales de descarga fuerte (Control descarga fuerte: $9,70 \pm 0,14$ u.a.f. de FM1-43; BPB descarga fuerte: $9,31 \pm 0,11$ u.a.f. de FM1-43; $p > 0,05$; Control de descarga débil: $13,78 \pm 0,25$ u.a.f. de FM1-43; BPB descarga débil: $11,11 \pm 0,39$ u.a.f. de FM1-43; $p < 0,01$ ANOVA). El cambio en las fluorescencias iniciales, junto con la ausencia de efecto en las constantes temporales de exocitosis, nos llevó a concluir que el efecto observado en lo relativo al aumento de la tasa de liberación (y por tanto la inversión en el porcentaje relativo de botones) en la condición de BPB, era atribuible a una disminución de las fluorescencias iniciales relacionado con el mantenimiento del contacto físico de algunas cisternas endocitóticas con el espacio extracelular, lo que posibilitaría el acceso del BPB pero no permitiría que la sonda se lavase en condiciones normales. En cualquier caso, la contribución del fenómeno de "kiss&run" es cuanto menos discutible ya que el mismo argumento empleado para explicar la ausencia de lavado de la sonda del interior luminal de aquellas vesículas que experimentan este tipo de procesos, es aplicable al proceso inverso, lo que imposibilitaría su incorporación en la vesícula durante la carga. Más adelante se discutirán exhaustivamente estos resultados y la posible implicación del fenómeno de "kiss&run" en nuestra preparación.

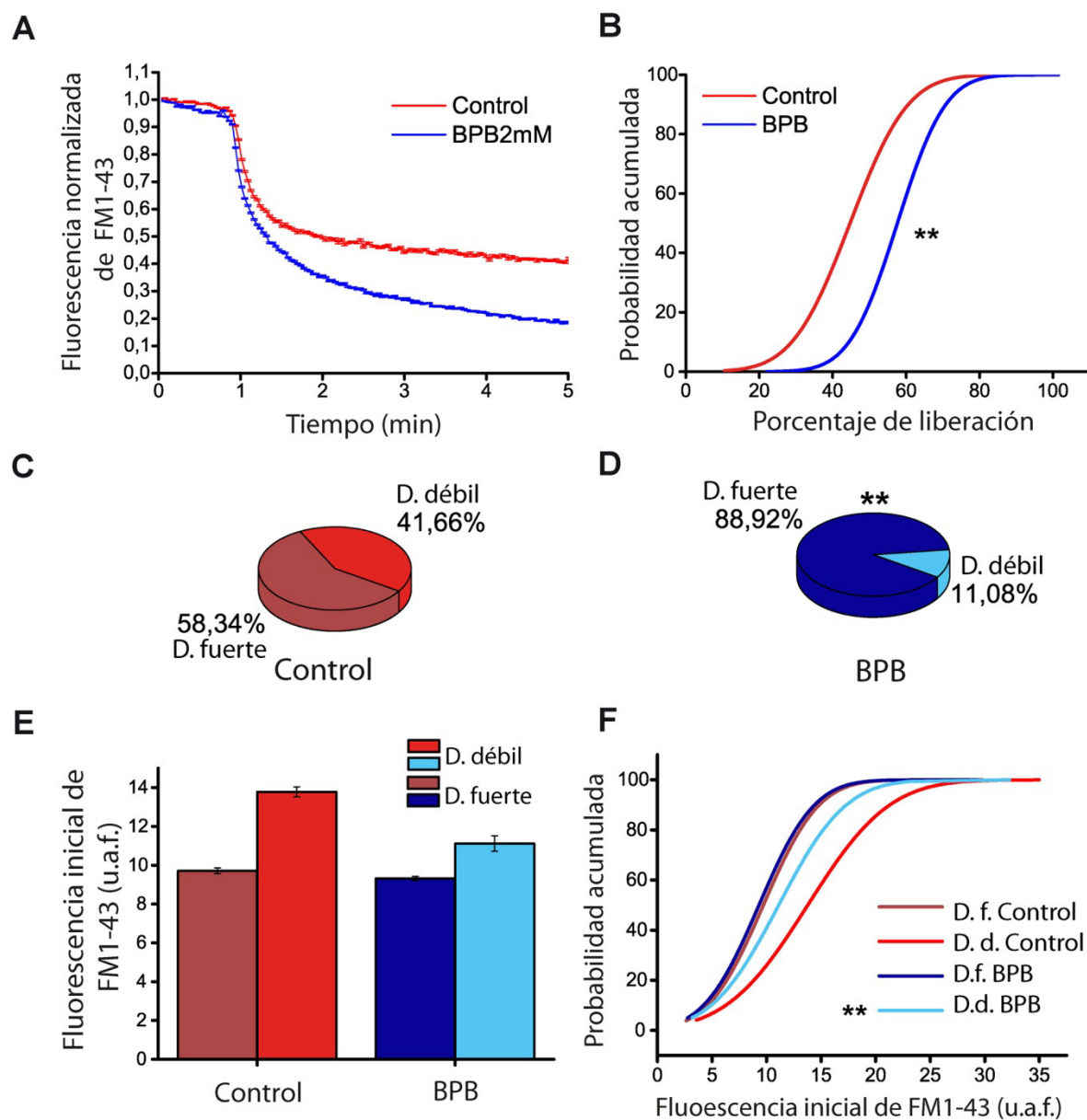


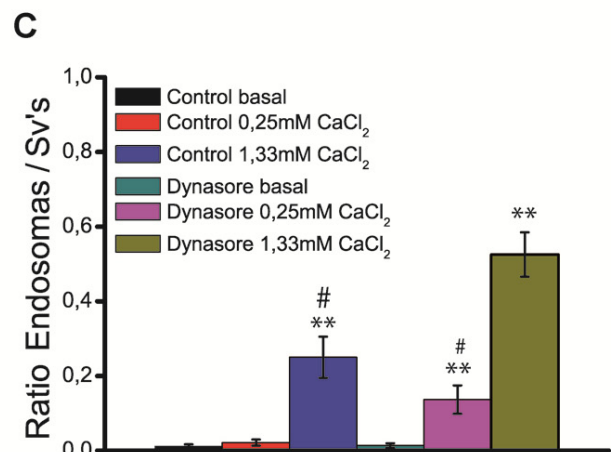
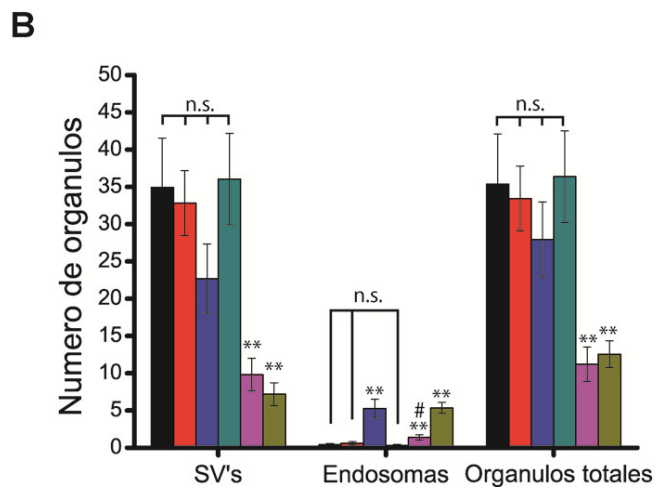
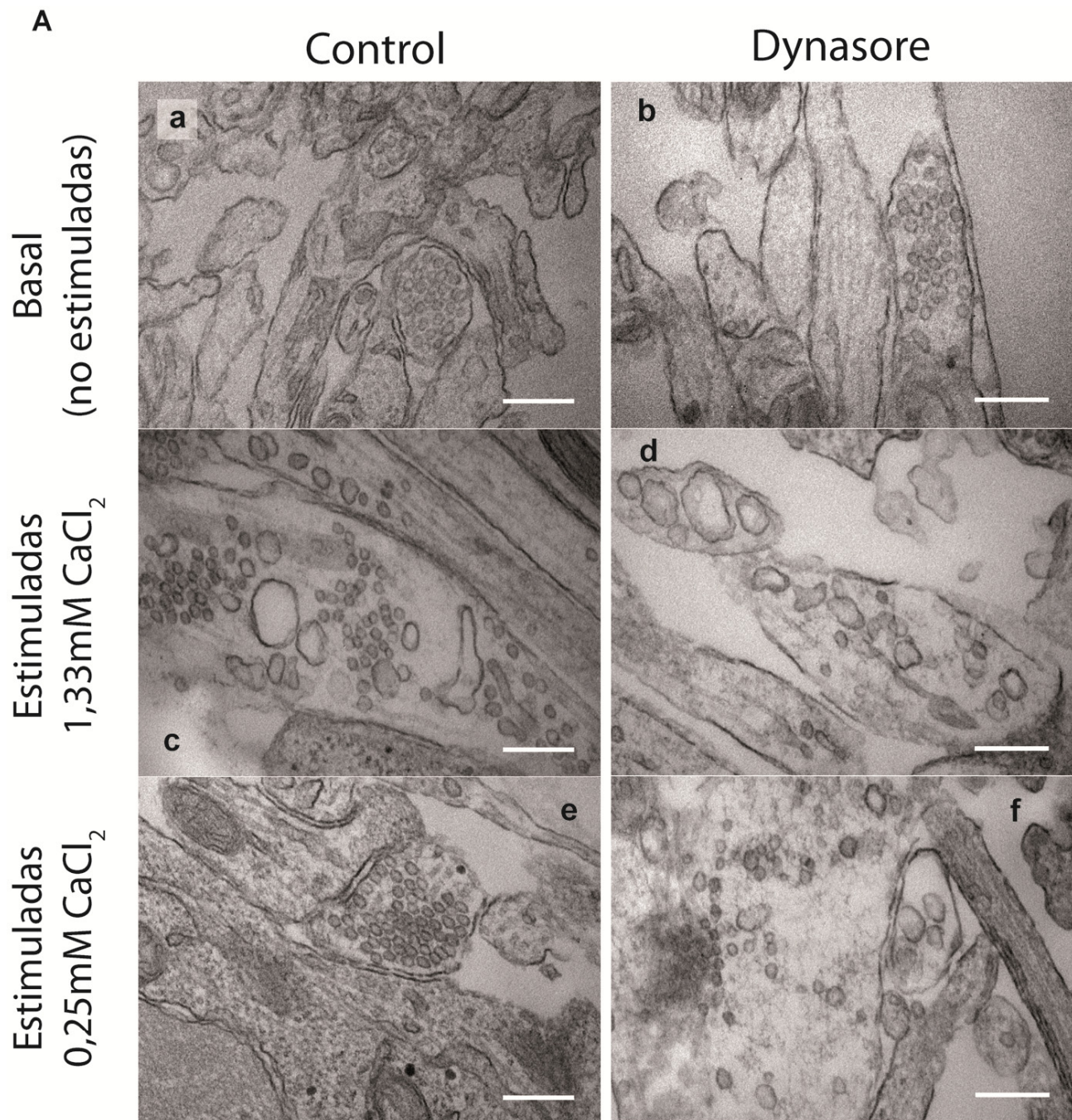
Figura 10- Cinéticas de descarga en la condición control (rojo) y en la condición BPB (azul) (A) y distribución de probabilidad acumulada de los porcentajes de liberación (B) en ambas condiciones. En (C) y (D) se muestran los porcentajes relativos de botones en cada condición. (E) Comparación de las medias de fluorescencia inicial en cada uno de los grupos, en F) se muestran las distribuciones de probabilidad acumulada de las fluorescencias iniciales de cada grupo (** $p < 0,01$; K-S test en B y F; ANOVA con Bonferroni en D).

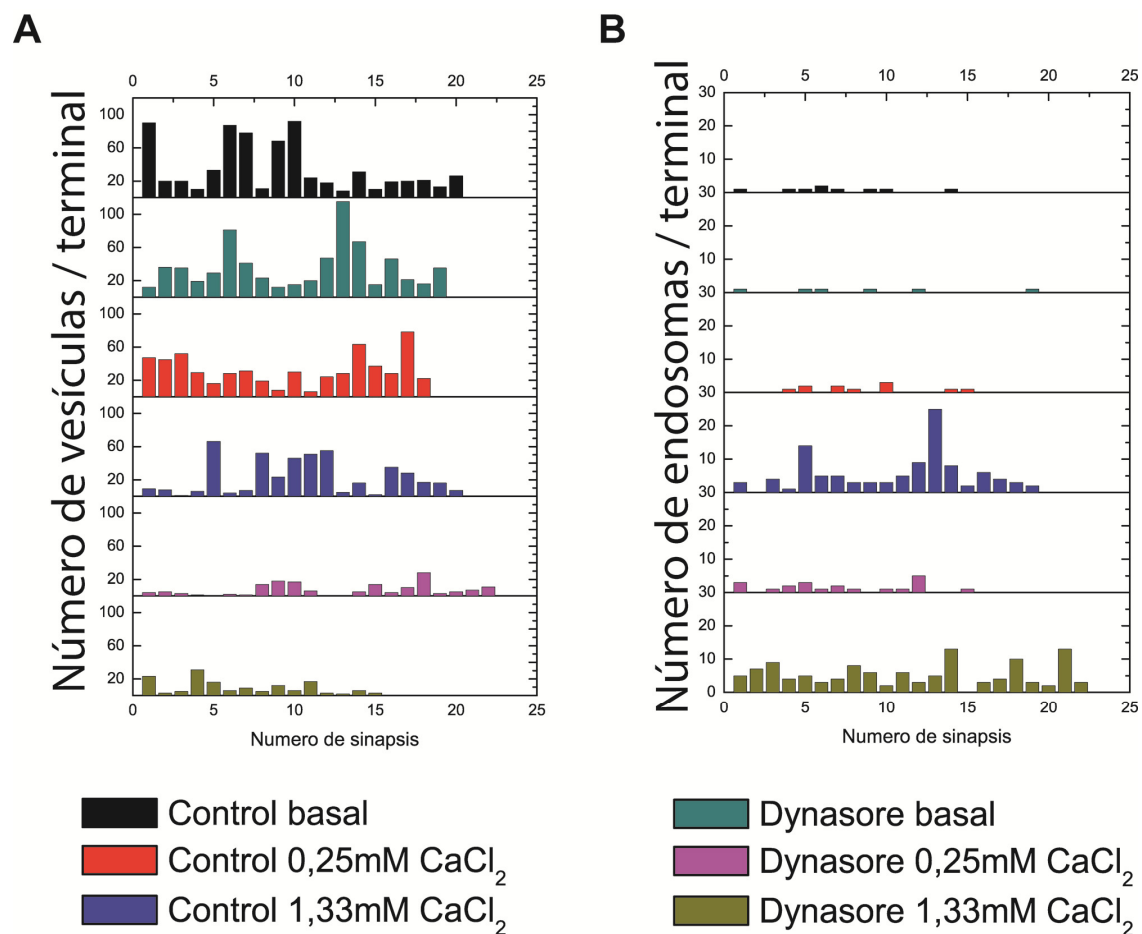
8- Análisis ultraestructural del ciclo vesicular sináptico: las formas ineficaces de reciclamiento están asociadas a endocitosis en masa

Con el objeto de dilucidar qué tipo de orgánulos estaban asociados a las formas ineficaces de reciclamiento, decidimos llevar a cabo experimentos de microscopía electrónica en aquellas condiciones que provocaron un efecto drástico en nuestra preparación (bien referido a parámetros cinéticos o referido a parámetros de fluorescencia inicial). Por ello se eligieron las siguientes seis condiciones: i) Control en reposo (sin estimular), empleado para las comparaciones estadísticas; ii) Control estimulado (ClCa_2 1,33mM); iii) Control estimulado (CaCl_2 0,25mM); iv) Dynasore en reposo; v) Dynasore estimulado (CaCl_2 1,33mM); vi) Dynasore estimulado (CaCl_2 0,25mM). Se analizó el número total de orgánulos, clasificándose estos en función de su diámetro como vesículas sinápticas (<40nm diámetro) o como endosomas (>40nm diámetro), y analizándose entre 15 y 20 terminales por condición. En condiciones control, en ausencia de estimulación, los terminales analizados se mostraban exclusivamente poblados por vesículas sinápticas pequeñas ($n=20$, 35 ± 7 SVs/terminal) y carentes de endosomas terminales en la mayoría de los casos ($n=20$, $0,45 \pm 0,13$ endosomas/terminal) lo que no difería de la pre-incubación con dynasore ($n=19$, $36,0 \pm 6,0$ SVs/terminal [$p > 0,05$]; $0,32 \pm 0,11$ endosomas/terminal [$p > 0,05$], ANOVA con Bonferroni). En condiciones control, la estimulación neuronal daba lugar a distintos efectos ultraestructurales en función de la concentración de calcio empleada. Encontramos que la estimulación a concentraciones fisiológicas de calcio (1,33mM CaCl_2) desencadenaba la acumulación de endosomas, en detrimento del número de SVs, lo que indicaba una relación exo/endocitótica entre estos dos tipos de orgánulos ($n=20$, $22,0 \pm 5,0$ SVs/terminal [$p > 0,05$]; $5,0 \pm 1,0$ endosomas/terminal [$p < 0,01$], ANOVA con Bonferroni). De forma acorde a lo esperado teniendo en cuenta los datos cinéticos,

encontramos que la estimulación a bajas concentraciones de calcio ($0,25\text{mM CaCl}_2$) no provocaba la aparición de los mencionados endosomas terminales ($n=18$, $33,0\pm 4,0\text{SVs/terminal}$ [$p>0,05$]; $0,6\pm 0,2$ endosomas/terminal [$p>0,05$] ANOVA con Bonferroni). Estos resultados pusieron de manifiesto que en condiciones control, la estimulación persistente con altas concentraciones de calcio activaba mecanismos de endocitosis consistentes en la recuperación de grandes fracciones de membrana, y que estos mecanismo coexistían con la endocitosis mediada por clatrina. A bajas concentraciones de calcio estos mecanismos no se activaban, lo que indicaba que la magnitud del estímulo era un factor clave en el desencadenamiento de uno u otro tipo de endocitosis. En presencia del inhibidor de la actividad GTPasa de la dinamina, la estimulación con concentraciones fisiológicas de calcio ($1,33\text{mM CaCl}_2$) dio lugar a un vaciamiento de vesículas sinápticas, concomitante con la aparición de estructuras endosomales ($n=22$, $7,0\pm 2,0$ SVs/terminal [$p<0,01$], $5,0\pm 1,0$ endosomas/terminal [$p<0,01$], ANOVA con Bonferroni) cambiando de forma drástica la apariencia ultraestructural de los terminales presinápticos analizados. Al disminuir el calcio en la solución de estimulación ($0,25\text{mM CaCl}_2$) en presencia de Dynasore, encontramos una reducción en el número de vesículas sinápticas que no era paralela a la aparición de cisternas endocitóticas tipo endosoma ($n=15$, $10,0\pm 2,0$ SVs/terminal [$p<0,01$], $1,0\pm 0,5$ endosomas/terminal [$p>0,05$], ANOVA con Bonferroni). Estos resultados indican i) que las estructuras responsables de la internalización dinamina-independiente de FM1-43 a concentraciones fisiológicas de calcio son endosomas, este hecho da cuenta de su baja eficacia de reciclamiento; ii) que la intensidad de estimulación es crucial a la hora de determinar qué mecanismos de recuperación de membrana se activan y iii) que ambas vías de endocitosis pueden coexistir en un mismo terminal presináptico.

El agotamiento de las vesículas de los terminales estimulados a bajas concentraciones de calcio en presencia de Dynasore es compatible con un defecto neto de la recuperación de membrana, por ser todas las formas de endocitosis activadas en estas condiciones dinamina-dependientes, y con la ausencia de marcaje con FM1-43 observado en los experimentos funcionales. Además en esta última condición, las vesículas remanentes del terminal presináptico se encontraban a una gran distancia de la zona activa, lo que es compatible con un agotamiento de las vesículas del "pool" de reciclamiento, asumiendo la hipótesis de que son factores posicionales los que determinan la pertenencia a uno u otro "pool" de vesículas sinápticas (Park *et al.*, 2012). Los endosomas encontrados al estimular con alto calcio darían cuenta de la baja eficacia de reciclamiento exhibida por algunos botones (descarga débil) de la condición control y de la ausencia de descarga tras una segunda ronda de estimulación observada en aquellos terminales que habían internalizado FM1-43 en presencia de Dynasore. El análisis de los campos individuales mostró heterogeneidad en la presencia de endosomas en la condición de estimulación con 1,33mM CaCl₂ en condiciones control lo que de nuevo es compatible con la variedad de respuestas encontradas al realizar experimentos funcionales; sin embargo, la presencia de endosomas era más homogénea en el caso de los terminales estimulados en presencia de Dynasore, lo que de nuevo es compatible con la ausencia de reciclamiento mostrada por los terminales presinápticos en esta condición. Además, en condiciones de alta eficacia de reciclamiento (Control estimulado en 0,25mM CaCl₂) los terminales analizados se encontraban poblados homogéneamente por vesículas sinápticas, indicando que son estas últimas las que dan cuenta de una eficacia de reciclamiento elevada.





←**Figura 11-** Ultraestructura de los terminales en reposo en la condición control (Aa) y tratados con Dynasore (Ab). La estimulación con 1,33mM CaCl_2 en control (Ac) dio lugar a la coexistencia de ambos tipos de orgánulos (SVs y endosomas) y a la acumulación de endosomas tras el tratamiento con Dynasore (Ad). La estimulación con 0,25mM CaCl_2 no dio lugar a la generación de endosomas en condiciones control (Ae) y sólo provocó un agotamiento de vesículas tras tratar con Dynasore (Af), obsérvese que las SVs más alejadas de la zona activa no se consiguieron movilizar. Barra de escala: 200nm en todos los casos. B) Cuantificación de los datos ultraestructurales, se analizaron el número de SV's, de endosomas y de orgánulos totales [n.s., no significativo; ** $p < 0,01$ vs Control Basal; # $p < 0,05$ vs Dynasore 1,33mM CaCl_2] ANOVA con Bonferroni; C) Cociente entre el número de endosomas y el de SV's en las distintas condiciones, [n.s., no significativo ** $p < 0,01$ vs Control Basal; # $p < 0,05$ vs Dynasore 1,33mM CaCl_2] ANOVA con Bonferroni.//↑ **Figura 12-** Número de vesículas sinápticas (A) y de endosomas (B) encontrado en cada uno de los botones analizados. Cada unidad en "x" corresponde a una sinapsis individual, equivalente en A y en B, obsérvese que en la condición control estimulado con alto calcio existe una heterogeneidad en lo que al contenido de orgánulos del terminal presináptico se refiere, coherente con las respuestas funcionales encontradas, mientras que en la condición de Dynasore estimulado con alto calcio, la distribución de endosomas es homogénea entre todos los botones estudiados.

9-La eficacia de reciclamiento como marcador de la maduración neuronal

Para estudiar la potencial existencia de una relación entre el grado de maduración de un cultivo neuronal y la eficacia de reciclamiento sináptico, decidimos caracterizar el patrón de maduración exhibido por las neuronas granulares de cerebelo, analizando para ello la expresión de distintas proteínas sinápticas a distintos días *in vitro* (3, 7 y 14 DIV), así como otros parámetros relacionados con la adquisición de competencias exo/endocitóticas plenas tales como las fluorescencias iniciales exhibidas por las distintas sinapsis de la preparación, lo que se relaciona con su contenido vesicular total (Mozhayeva *et al.*, 2002). Las proteínas escogidas para el análisis de su expresión fueron: Dinamina, Syntaxina, Sinaptojanina y Sinapsina, empleándose como control de carga Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa (GAPdh) o β -Tubulina. Encontramos que la maduración neuronal promovía un incremento de expresión de las proteínas sinápticas analizadas, al normalizar estos valores al encontrado a 3DIV (Figura 13A). El principal aumento de expresión tenía lugar entre 3 y 7DIV (Figura 13B), estabilizándose posteriormente los niveles de expresión de las proteínas estudiadas. Los niveles de expresión de las distintas proteínas a distintos días *in vitro*, así como los valores de significación estadística, se recogen en la tabla 1. De forma paralela encontramos un aumento global de los niveles de fluorescencia inicial en ambos grupos de descarga (Figura 13C, Descarga fuerte; 3DIV: $7,05 \pm 0,26$ u.a.f. FM1-43; 7DIV: $13,27 \pm 0,21$ u.a.f. de FM1-43 [$p < 0,01$]; 14DIV: $23,69 \pm 0,25$ u.a.f. de FM1-43 [$p < 0,01$]; Descarga débil; 3DIV: $8,85 \pm 0,47$ u.a.f. de FM1-43; 7DIV: $15,43 \pm 0,39$ u.a.f. de FM1-43 [$p < 0,01$]; 14DIV: $31,15 \pm 0,50$ u.a.f. de FM1-43 [$p < 0,01$]; ANOVA con Bonferroni, vs 3DIV en cada grupo), lo que es indicativo del aumento total del pool de vesículas sinápticas a lo largo de la maduración del cultivo, resultados acordes a los publicados previamente (Mozhayeva *et al.*, 2002).

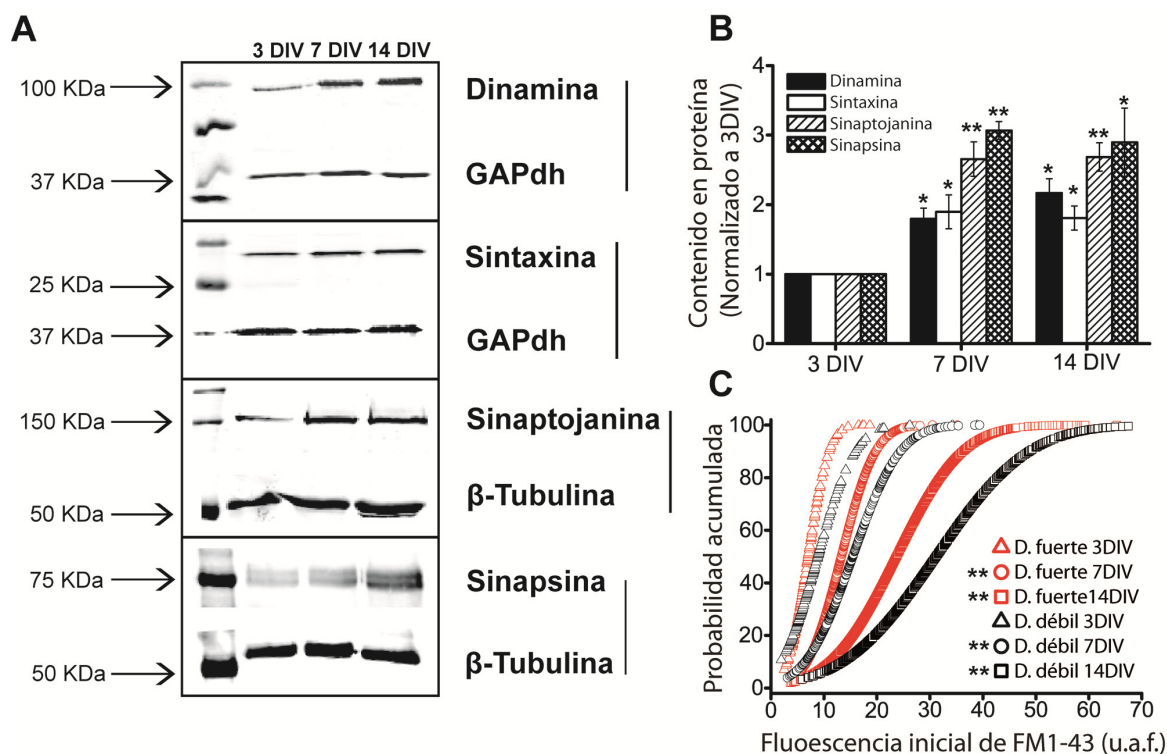


Figura 13- A) Estudio del patrón de expresión de distintas proteínas sinápticas mediante inmunodetección de extractos obtenidos a partir de células de 3, 7 o 14 Días *In Vitro*. B) Cuantificación de los datos obtenidos tras normalizar al valor de 3DIV, obsérvese que tras 7DIV seestabilizaron los niveles de expresión de las distintas proteínas analizadas. C) Distribución de probabilidad acumulada de las fluorescencias iniciales de cada uno de los grupos de descarga obtenidas a 3, 7 y 14 DIV (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs 3DIV, ANOVA con Bonferroni en B; K-S test en C).

Una vez caracterizado el curso temporal de maduración en lo concerniente a los niveles de expresión de proteínas y a las fluorescencias iniciales, decidimos caracterizar la maduración del cultivo en función del porcentaje de cada uno de los grupos de descarga a los distintos días *in vitro*, así como del porcentaje de descarga exhibido por cada uno de los grupos. Encontramos que la maduración funcional del cultivo era paralela a un incremento de los botones de descarga fuerte presentes en la preparación. De forma

similar a lo observado con el patrón de expresión de las distintas proteínas, se comprobó que el aumento principal del porcentaje de botones de descarga fuerte acontecía en la ventana temporal comprendida entre 3 y 7 DIV's (Figura 14A; Descarga fuerte, 3DIV: $50,0 \pm 4,1\%$; 7DIV: $63,9 \pm 7,4\%$, $p < 0,05$; 14DIV: $66,2 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$; Descarga débil, 3DIV: $50,0 \pm 4,1$; 7DIV: $36,1 \pm 7,4$, $p < 0,05$; 14DIV: $33,8 \pm 3,4$, $p < 0,05$). La tasa de descarga normalizada a la fluorescencia inicial del grupo de descarga fuerte no se vio modificada a lo largo del desarrollo del cultivo (Figura 14B; Porcentaje de descarga, 3DIV: $63,9 \pm 1,1\%$; 7DIV: $60,3 \pm 1,8\%$, $p > 0,05$; 14DIV: $63,0 \pm 1,1\%$, $p > 0,05$; Prueba t de Student vs 3DIV), mientras que el grupo de descarga débil experimentó un ligero aumento de esta fracción a los 14DIV (Figura 14B; Porcentaje de descarga, 3DIV: $35,6 \pm 3,0\%$; 7DIV: $38,7 \pm 1,1\%$, $p > 0,05$; 14DIV: $43,3 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$; Prueba t de Student vs 3DIV). A diferencia de las fracciones de descarga, las constantes temporales de exocitosis sufrieron una disminución a lo largo del desarrollo del cultivo, lo que es coherente con un aumento de la velocidad de exocitosis y por tanto, de la eficacia de reciclamiento vesicular (Figura 14C; τ Descarga fuerte, 3DIV: $12,08 \pm 0,69s$; 7DIV: $8,94 \pm 0,61s$, $p < 0,01$; 14DIV: $9,79 \pm 0,69s$, $p < 0,05$ // τ Descarga débil, 3DIV: $24,03 \pm 1,32s$; 7DIV: $15,55 \pm 1,36s$, $p < 0,01$; 14DIV: $14,96 \pm 0,76s$, $p < 0,01$; Prueba t de Student vs 3DIV en todos los casos).

La inhibición crónica de la actividad en cultivos neuronales (bien con bloqueantes de los canales de sodio voltaje dependientes, bien con antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato), parece producir un efecto homeostático (Buonomano, 2005; Turrigiano, 2008), promoviendo la expresión y acumulación de determinadas proteínas presinápticas tales como RIM, VGluT-1, Sinaptotagmina y Canales de calcio tipo P/Q. Este efecto sobre la expresión de proteínas sinápticas, descrito como una remodelación

de las zonas activas (Lazarevic *et al.*, 2011) guarda relación con un efecto heterogéneo sobre la probabilidad de liberación, aumentando este parámetro, al menos en una población de sinapsis (Lazarevic *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012). En nuestro caso, adicionamos (TTx 1 μ M) al medio de cultivo las 24 horas previas a la realización del experimento, para evaluar posibles efectos de la inactivación crónica sobre la eficacia de reciclamiento. No encontramos efecto de TTx a los 7DIV sobre los porcentajes de respuesta exocitótica en ninguno de los grupos (Figura 14B, TTx; Grupo de descarga fuerte: 56,32 \pm 1,58%, $p>0,05$; Grupo de descarga débil: 37,47 \pm 1,93%, $p>0,05$; Prueba t de Student vs Control 7DIV en ambos casos), sin embargo encontramos una inversión de los porcentajes relativos de respuestas mostrados a 7DIV en condiciones normales (Figura 14A; TTx 7DIV; Botones de descarga fuerte: 30,42 \pm 6,59%, $p<0,05$; Botones de descarga débil: 69,58 \pm 6,59%, $p<0,05$, Prueba t de Student vs Control 7DIV en ambos casos) que fue acompañada por una reducción selectiva de las constantes temporales de exocitosis en el grupo de descarga débil (Figura 14C; TTx 7DIV, τ Descarga fuerte: 7,51 \pm 0,43s, $p>0,05$; τ Descarga débil: 8,35 \pm 0,60s, $p<0,01$, Prueba t de Student vs Control a 7DIV en ambos casos). Nuestra interpretación de estos resultados se basa en asumir que el aumento de la probabilidad de liberación inducido por la inactivación crónica del cultivo genera una oleada masiva de exocitosis ante la llegada de estimulación que promueve la puesta en marcha de formas de endocitosis no vesiculares asociadas a reciclamiento ineficiente. La disminución de las constantes temporales de exocitosis de los botones de baja eficacia de reciclamiento apoya esta hipótesis, ya que es un indicativo de una adaptación, en términos cinéticos, de la eficacia de reciclamiento, que aparece de forma concomitante al aumento en la probabilidad de liberación. Por tanto podemos concluir que el aumento en la eficacia de exocitosis durante el periodo de carga con FM1-43 (se puede establecer cierto paralelismo entre

este parámetro y la probabilidad de liberación) es el responsable de la baja eficacia de reciclamiento que se pone de manifiesto durante una segunda ronda de estimulación.

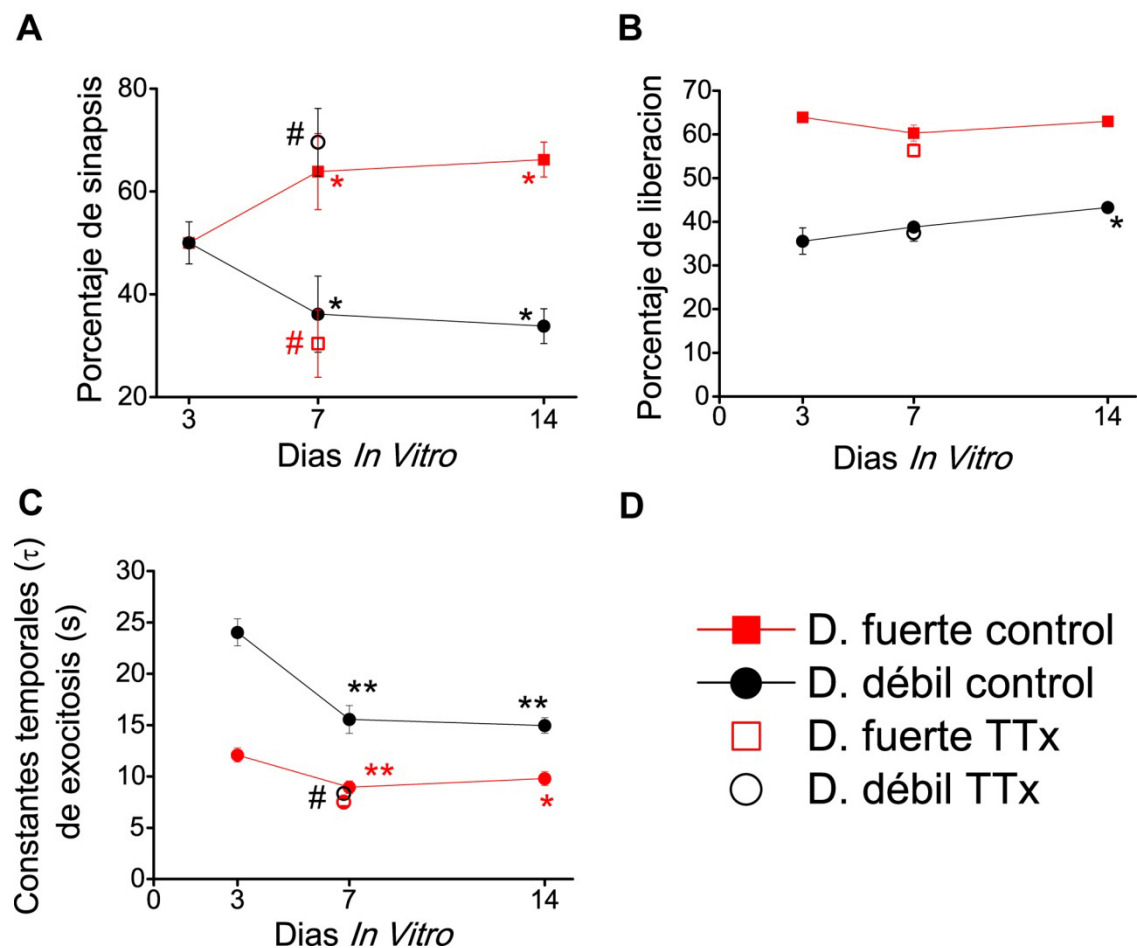


Figura 14- Maduración funcional del cultivo evaluada atendiendo al porcentaje de respuestas exocitóticas de cada tipo (A), el porcentaje de liberación de cada grupo de respuesta (B) y la constante de decaimiento exhibida por cada grupo de respuesta (C) a los distintos días *in vitro*. El efecto de TTx se muestra con símbolos vacíos en los distintos paneles. Leyenda en (D). (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ vs Control 3DIV; # $p < 0,05$ vs Control 7DIV, Prueba t de Student)

Como parte de una colaboración con la doctora Hurtado, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos en un contexto en el que la maduración celular del cultivo estaba potenciada artificialmente mediante el uso de un fitoestrógeno. Los fitoestrógenos son

moléculas vegetales no esteroideas (en su mayoría isoflavonas), que tienen efectos estrogénicos por su similitud estructural con el 17- β -Estradiol. En neuronas los efectos de los fitoestrógenos parecen derivar de una combinación de la activación de receptores de estrógenos canónicos (Turner *et al.*, 2007) y de receptores nucleares PPAR γ (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) (Shen *et al.*, 2006). Las acciones de los fitoestrógenos son una aceleración de la diferenciación neuronal y un aumento en la expresión de la proteína sináptica sinaptofisina (Chindewa *et al.*, 2008), efecto que reproduce el agonista PPAR γ rosiglitazona (Sayan-Ozacmak *et al.*, 2011). Encontramos que la aplicación del fitoestrógeno Daidzeína (0,5 μ M, 24h) produjo un aumento de la eficacia global de reciclamiento, manifestado como un aumento en la proporción de botones de descarga fuerte respecto a la de descarga débil, que fue revertido a niveles basales al coincubar con el antagonista PPAR γ T0070907 a una concentración de 1 μ M (Figura 15A; Relación de botones descarga fuerte/ botones descarga débil; Control: $2,20 \pm 0,18$; N=3, n=3260; Daidzeína: $3,18 \pm 0,33$; N=5, n=5704 [$p < 0,05$]; Daidzeína + T0070907: $1,94 \pm 0,16$; N=4, n= 3371 [$p > 0,05$]; ANOVA con Fisher). A diferencia de en la proporción de botones de cada tipo, ninguno de los tratamientos produjo una modificación de las cinéticas de respuesta de las distintas subpoblaciones de botones (Figura 15 B). Sin embargo encontramos un aumento de las fluorescencias iniciales tras el tratamiento con Daidzeína que fue prevenido tras la coincubación con el antagonista PPAR γ (Figura 15C, Fluorescencia inicial media; Control: $2337,53 \pm 22,70$ u.a.f. FM1-43; Daidzeína: $2990,61 \pm 20,25$ u.a.f. FM1-43, [$p < 0,01$]; Daidzeína + T0070907: $2426,87 \pm 22,49$ u.a.f. FM1-43, [$p < 0,05$]; ANOVA con Bonferroni), lo que indica un aumento del número de vesículas presentes en los terminales presinápticos, de forma acorde a lo descrito por otros grupos (Mozhayeva *et al.*, 2002). Además, dado que el aumento de las fluorescencias iniciales no se correspondía con una disminución de la

tasa de descarga de FM1-43, este aumento indicaba un aumento de la eficacia de reciclamiento del contenido vesicular de los elementos presinápticos del cultivo

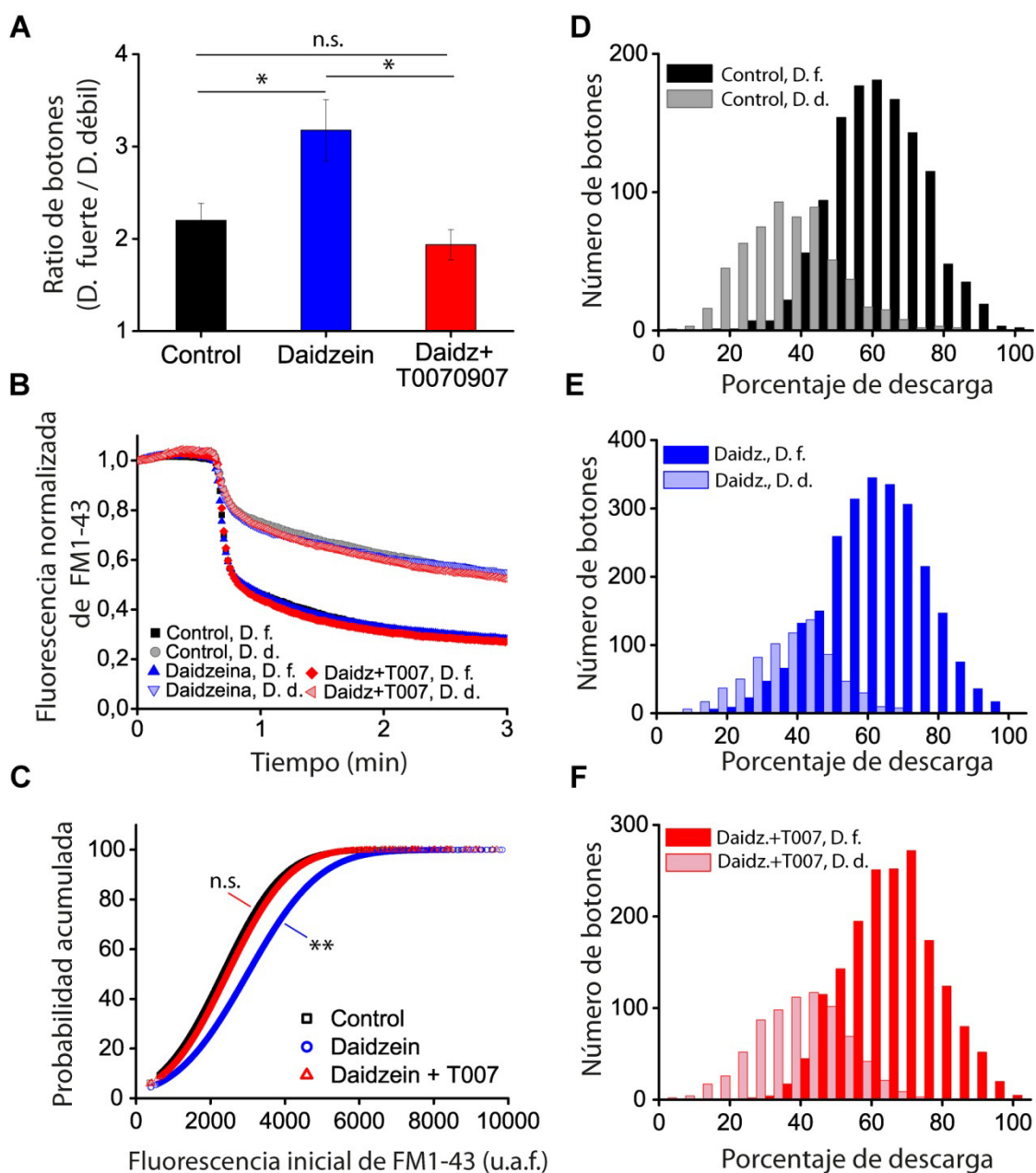
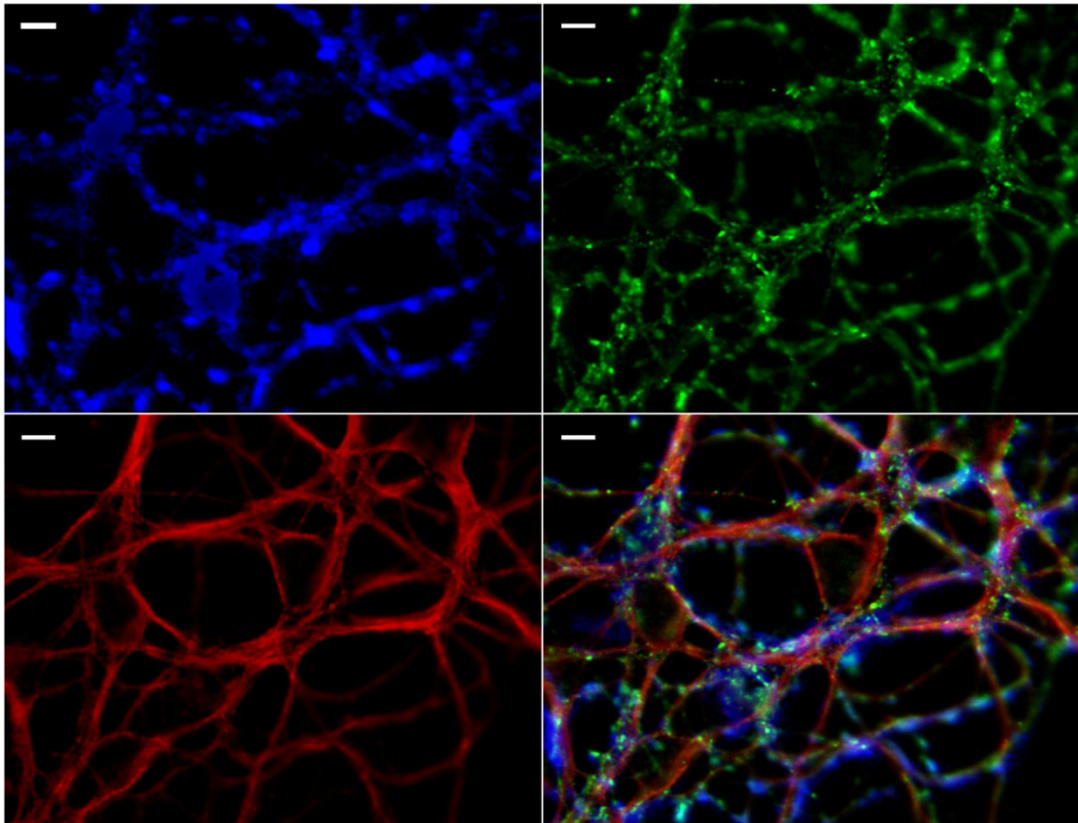


Figura 15- A) Cociente botones de descarga fuerte/botones de descarga débil. B) Medias cinéticas de los distintos grupos de botones en las distintas condiciones experimentales. C) Fluorescencias iniciales de los botones ante las distintas condiciones. D, E y F) Histogramas de distribución de frecuencias de descarga de FM1-43 en Control, Daidzeína y Daidzeína+T0070907 respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ANOVA con Fisher en Fig. 15A y K-S Test en Fig 15C.

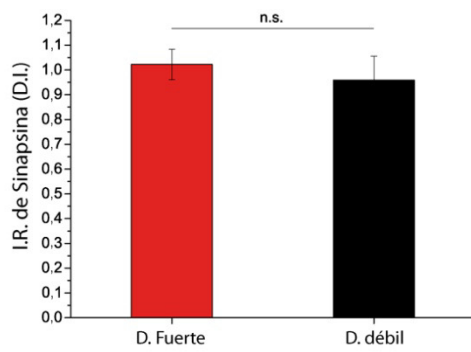
10-Marcadores presinápticos asociados con la eficacia de reciclamiento

Para esclarecer si existía algún tipo de relación entre la heterogeneidad en la eficacia de reciclamiento y las características intrínsecas de los distintos botones en términos de expresión de proteínas, llevamos a cabo series de experimentos en los que de forma posterior al análisis de la eficacia de reciclamiento mediante FM1-43, se llevó a cabo una inmunocitoquímica *post-hoc* según se ha detallado en la sección de métodos. Se analizó una batería de proteínas presinápticas implicadas en procesos de exocitosis (Sinapsina, Fosfosinapsina y Munc13-1) o endocitosis (Dinamina y Calcineurina), proteínas de citomatriz (Bassoon) y proteínas vesiculares (VGluT1) así como el marcador postsináptico GluA3, subunidad de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA asociados a estados de inmadurez sináptica (Condorelli *et al.*, 1993; Incontro *et al.*, 2011). Encontramos que tras separar las inmunorreactividades de sinapsis individuales en función de la pertenencia a uno u otro grupo de descarga, algunos de los marcadores segregaban en paralelo con la tasa de descarga. En concreto encontramos que las proteínas Bassoon, Munc13-1, Calcineurina y la forma fosforilada de la Sinapsina se encontraban enriquecidas con respecto a la media de la población, en aquellas sinapsis con una mayor eficacia de reciclamiento. Por el contrario, la subunidad GluR3 de los receptores AMPA se expresaba mayoritariamente en aquellos puntos en oposición a las sinapsis con una menor eficacia de reciclamiento. A diferencia de estas proteínas mencionadas cuya inmunorreactividad era variable en función del grupo de sinapsis analizadas, las inmunorreactividades de las proteínas Sinapsina, Dinamina y VGluT1 no mostraron ningún tipo de segregación paralela a la segregación de respuestas cinéticas.

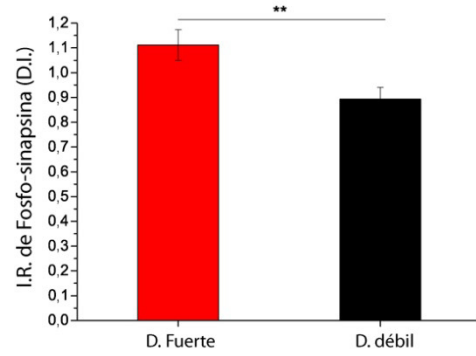
A



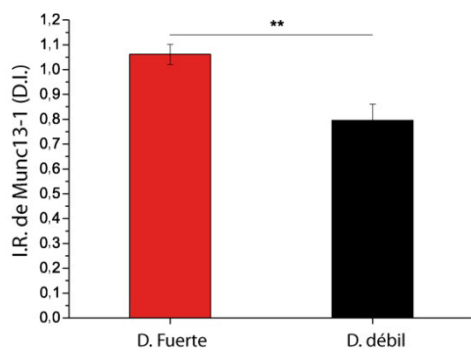
B



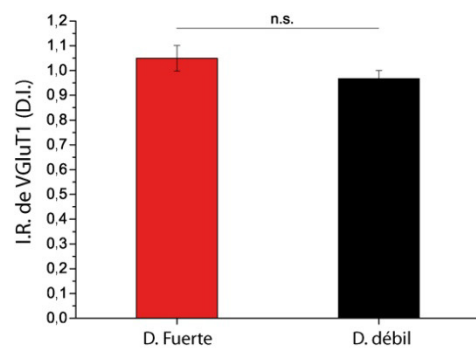
C

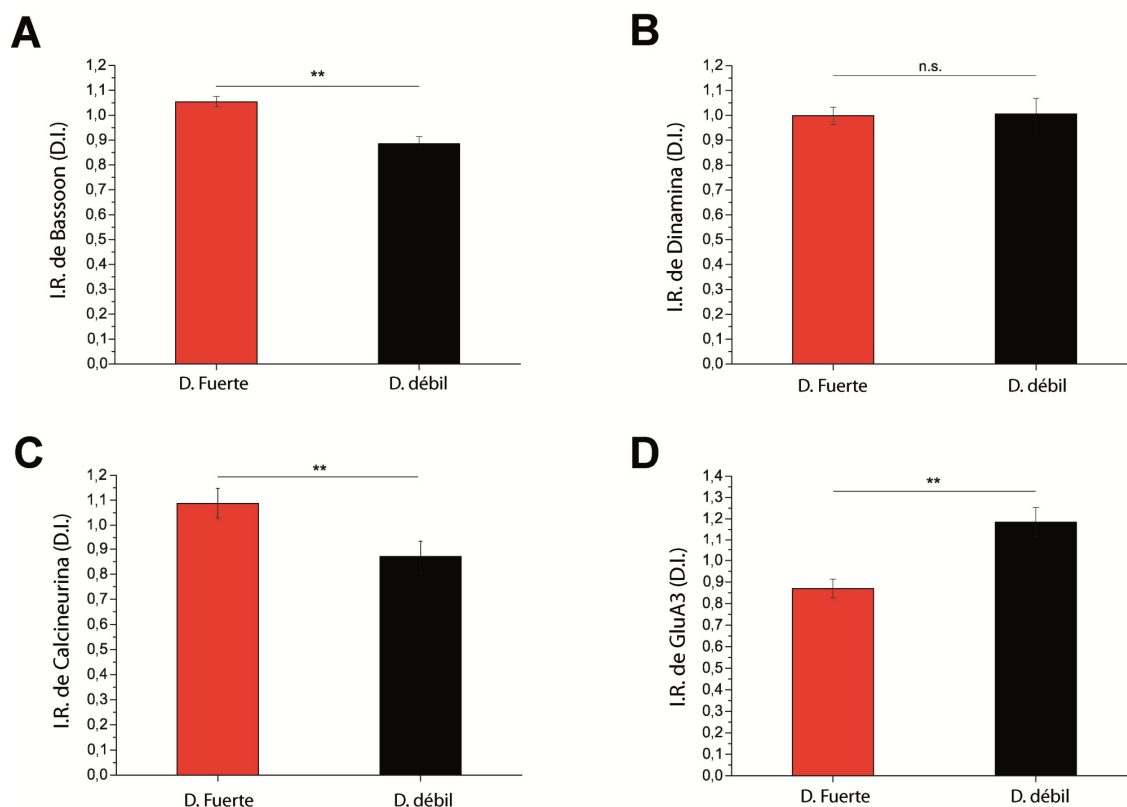


D



E





← **Figura 16-** A) Ejemplo de inmunocitoquímica *post-hoc*. Se muestra en azul (pseudocolor) la imagen correspondiente a la sonda FM1-43 (experimento en célula viva), en verde el marcaje de la forma fosforilada de la sinapsina y en rojo el marcaje de la subunidad GluA3 del receptor ionotrópico de glutamato de tipo AMPA, barra de escala 5µm. A continuación se muestran las comparaciones de las inmunoreactividades (IR) medias de cada uno de los grupos de descarga para Sinapsina (B), Fosfosinapsina (C), Munc13-1 (D) y VGluT1 (E) respectivamente (n.s., no significativo; ** $p < 0,01$ Prueba t de Student) // ↑ **Figura 17-** Comparacion de las IRs medias de cada uno de los grupos para Bassoon (A), Dinamina (B), Calcineurina (C) y la subunidad del receptor AMPA GluA3 (D). Obsérvese que únicamente la subunidad GluA3 está enriquecida en las postsinapsis en aposición a elementos presinápticos con un reciclamiento poco eficiente, ya que esta subunidad es característica de estadios de inmadurez sináptica (n.s., no significativo; ** $p < 0,01$ Prueba t de Student). En ambas figuras se ha normalizado a la inmunoreactividad media. En los anexos II y III se muestran las imágenes detalladas de las inmunocitoquímicas *post-hoc* de las distintas proteínas estudiadas

11-Receptores presinápticos y eficacia de reciclamiento

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la implicación de los receptores metabotrópicos en la maduración de la eficacia de reciclamiento, como parámetro asociado a la maduración neuronal. La primera aproximación llevada a cabo en este contexto fue el tratamiento a largo plazo (24h) con toxina pertúsica (PTx). Esta toxina cataliza la ADP-ribosilación de la subunidad α_i de proteínas G heterotriméricas de la familia α_i , interfiriendo con su mecanismo de acción (Burns, 1988). Se observó que el tratamiento prolongado de las células granulares con PTx, producía un aumento de la eficacia de reciclamiento de estas, manifestado en un aumento de las medias globales de descarga (Figura 18A y 18B Control: $55,28 \pm 0,84$ %, N=5, n=598; PTx: $65,16 \pm 0,48$ %, N=6, n=1320; $**p<0,01$ ANOVA con Bonferroni) así como en un aumento relativo del porcentaje de botones de descarga fuerte respecto al de los botones de descarga débil (Figura 18B; Porcentaje de botones de descarga fuerte; Control: $54,83 \pm 1,37$ %; PTx: $65,76 \pm 1,72$ %; $**p<0,01$ Prueba t de Student). Al analizar los datos observamos que un número similar de experimentos había dado lugar a un número altamente diferente de botones en las distintas condiciones, por ello se analizó la densidad de botones por unidad de longitud en las distintas condiciones experimentales. Se constató un aumento del número de botones sinápticos que incorporaban FM1-43 (expresado en botones/ μ m de neurita) tras el tratamiento de 24 horas con PTx (Figura 18C; Control: $0,07 \pm 0,016$ botones/ μ m; PTx: $0,13 \pm 0,01$ botones/ μ m; $*p<0,05$); de estos experimentos se deduce que la inhibición de los GPCR inhibitorios (del inglés *G-Protein Coupled Receptor*) producía un incremento en el número de sitios activos así como un aumento de la eficacia de reciclamiento de dichos sitios. En línea con estos experimentos decidimos inhibir de forma selectiva uno de los receptores metabotrópicos más abundante en las

neuronas granulares de cerebelo (Tsou *et al.*, 1998; Egertova y Elphick, 2000; Stephens, 2009) con importantes funciones tanto en el desarrollo y maduración de estas neuronas (Trazzi *et al.*, 2010) como en la regulación de su eficacia sináptica (Safo y Regehr, 2005; Safo *et al.*, 2006; Stephens, 2009), el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1R).

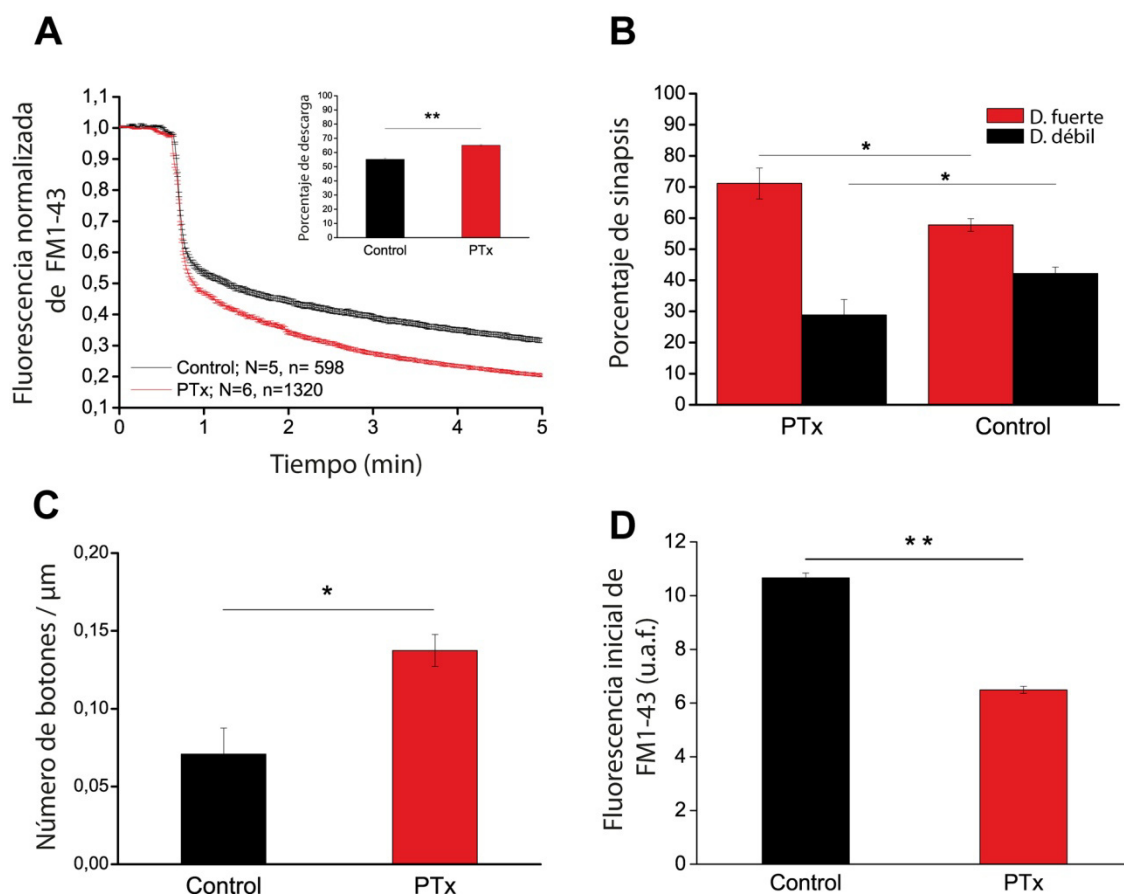


Figura 18- A) Medias cinéticas obtenidas en control y tras el tratamiento durante 24 horas con PTx. Los puntos de tiempo para calcular el porcentaje de descarga que se muestra en la figura insertada son $t = +1$ minuto a partir de la estimulación. B) Porcentaje de cada uno de los grupos de descarga tras el tratamiento con PTx de 24 horas. C) Densidad de botones (expresada en botones por μm de neurita). D) Fluorescencias iniciales de la población total de botones* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Prueba t de Student y ANOVA con Bonferroni.

Tratando de establecer un paralelismo entre la inhibición de la señalización por proteínas G inhibitorias y la inhibición del receptor de cannabinoides de tipo 1, se incubaron las células con SR141716 (5 μ M), antagonista selectivo del mencionado receptor, durante las 24 horas previas a la realización del experimento al igual que se había procedido en el caso de los experimentos con PTx.0020

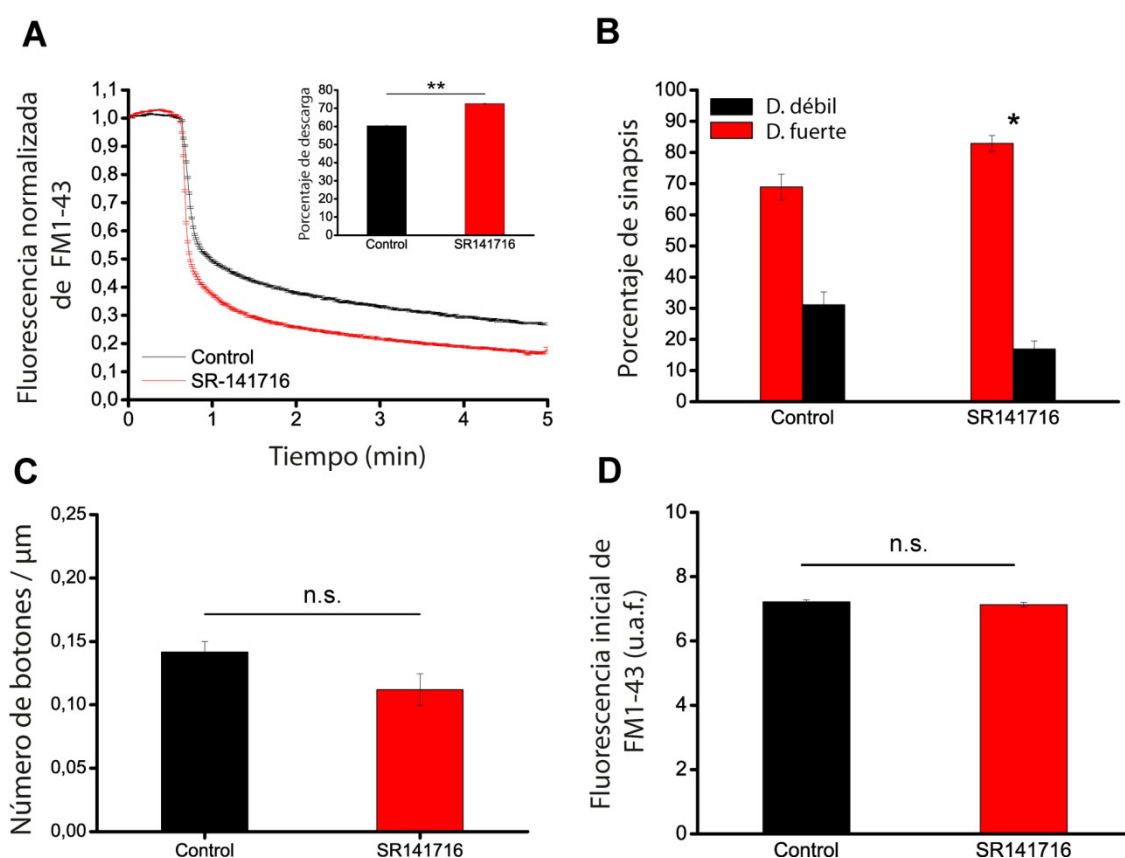


Figura 19- A) Medias cinéticas obtenidas tras el tratamiento de 24 horas con SR141716 y porcentaje medio de descarga obtenido a partir de los registros de botones individuales tras 1 minuto de perfusión con alto potasio (figura insertada). B) Porcentaje de los dos grupos de descarga en control y tras el tratamiento de 24h con SR141716. C) Densidades medias de botones (en botones por μ m) en control y tras el tratamiento prolongado con SR141716. D) Fluorescencias iniciales en control y tras el tratamiento con SR141716. n.s.: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Prueba t de Student.

El tratamiento durante 24 horas con SR141716 dio lugar a un aumento selectivo del porcentaje de botones con descarga fuerte (Figura 19B; Control descarga fuerte: $68,91 \pm 4,11$ % $N=8$, $n=3059$; SR141716 descarga fuerte: $82,83 \pm 2,54$ %, $N=8$, $n=3647$; * $p<0,05$ Prueba t de Student), lo que quedó reflejado en las medias cinéticas globales y por tanto en los porcentajes de descarga (Figura 19A; Control: $60,29 \pm 0,31$ %; SR141716: $72,53 \pm 0,34$; ** $p<0,01$; ANOVA con Bonferroni). Puesto que la adaptación homeostática puede ser bidireccional (Turrigiano, 2008; Mitra *et al.*, 2012), la aplicación de PTx durante las 24 horas previas a la realización del experimento podría conducir a un efecto en el cultivo opuesto al del tratamiento prolongado con TTx, en el cual se llevase una reducción homeostática de la actividad sináptica, lo que debería conllevar una disminución de las fluorescencias iniciales de los botones estudiados, debido a que, en este caso, el efecto homeostático consistiría en una disminución de la probabilidad de liberación al menos en una subpoblación de sinapsis durante la fase de carga. Motivados por esta especulación decidimos llevar a cabo las medidas de las fluorescencias iniciales de los botones en ambos tipos de experimentos. Encontramos una marcada disminución de las fluorescencias iniciales de los botones sinápticos en las células tratadas con PTx, que no se reproducía en los botones tratados con SR141716 (Figura 18D; Control: $10,65 \pm 0,18$ u.a.f. de FM1-43; PTx: $6,49 \pm 0,13$ u.a.f. de FM1-43; $p<0,01$ Prueba t de Student; Figura 19D; Control: $7,21 \pm 0,07$ u.a.f. de FM1-43; SR141716: $7,13 \pm 0,07$ u.a.f. de FM1-43; no significativo Prueba t de Student). Este hecho nos llevó a pensar que el bloqueo crónico de la señalización inhibitoria mediada por CB1 no era suficiente para mediar un efecto homeostático, mientras que la inhibición global de la señalización mediada por aquellos receptores acoplados a proteínas $G\alpha_i$ sí daba lugar a este efecto. Las diferencias en lo relativo a las fluorescencias iniciales sugieren que, a pesar de no producir un efecto homeostático en

estas células, el tratamiento prolongado con el antagonista del receptor CB1 ha de mediar un efecto directo durante la realización del experimento que conduce a las diferencias cinéticas observadas. Una de las limitaciones técnicas de la sonda FM1-43 es que requiere una estimulación prolongada y de alta intensidad durante el proceso de incorporación de la sonda en el lumen de las vesículas sinápticas, hecho que podría promover una síntesis masiva de endocannabinoides durante el proceso de carga, que regulase la eficiencia sináptica durante la fase de descarga (Hashimotodani *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005; Hashimotodani *et al.*, 2007). En este contexto, puesto que el SR141716 es un agonista inverso de los receptores de cannabinoides, podría estar regulando a la baja la señalización por endocannabinoides que tuviera lugar durante el periodo de carga y la fase de lavado. Por esta razón decidimos llevar a cabo experimentos en los que las células se expusieran a un agonista cannabinoide (HU-210) tras la fase de incorporación de la sonda, para comprobar si este tratamiento producía alguna modificación de la eficacia sináptica.

12- Regulación de la eficacia de liberación vesicular por el receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1R) e inducción de silenciamiento sináptico

La acción inhibitoria de los cannabinoides sobre la eficacia presináptica radica en una disminución de la entrada de calcio por inhibición de canales de calcio operados por voltaje y en una reducción de los niveles de cAMP en el compartimento presináptico por la inhibición llevada a cabo sobre la adenilato ciclasa por parte de las subunidades α_i de proteínas G (Kreitzer y Regehr, 2001; Brown *et al.*, 2004; Chevalleyre *et al.*, 2007). Tras corroborar tanto por medio de técnicas de inmunocitoquímica (Figuras 20A y Figura 20B; CB1R-Sinptofisina; Pendiente $0,672 \pm 0,005$; $r^2=0.681$; N=10, n =6598)

como de *western-blot* a partir de extractos de células a distintos días *in vitro* (Figura 20C), la expresión del mencionado receptor en nuestros cultivos de neuronas granulares, y con objeto de disecar molecularmente ambos tipos de inhibición en nuestros experimentos de ciclo vesicular, se diseñaron experimentos en los que, en lugar de una estimulación sostenida, se llevaban a cabo dos estimulaciones secuenciales, la primera de ellas de 10 segundos y la siguiente, tras un periodo de 1 minuto entre ambas estimulaciones, de 2 minutos 30 segundos. El razonamiento para llevar a cabo este tipo de experimentos fue el siguiente, una estimulación de baja magnitud nos permitiría detectar cambios atribuibles a la inhibición de la entrada de calcio, mientras que la estimulación prolongada pondría de manifiesto exclusivamente aquellos cambios atribuibles a modificaciones de la maquinaria de liberación, dado que el control inhibitorio sobre los nanodominios de calcio estaría presumiblemente eludido en estas condiciones de estimulación. El protocolo empleado se muestra en la figura 20D. Encontramos que la aplicación del agonista cannabinoide HU-210 durante los 10 minutos posteriores al proceso de carga provocaba una reducción dramática de la liberación de FM1-43 durante la estimulación inducida por el primer pulso (10s), que se mantenía en el segundo pulso (2'30"), lo que parecía indicar la independencia de esta reducción exocitótica de la inhibición de la entrada de calcio. Este efecto era mediado específicamente por el receptor CB1, ya que la coincubación con su agonista selectivo, el SR141716, suprimía la reducción de la liberación vesicular (Figura 20E y 20F, Control D1: $48,67 \pm 0,25$ %; Control D2: $23,36 \pm 0,16$ %; Control total: $72,04 \pm 0,23$ %, N=7, n=2790; HU-210 D1: $31,61 \pm 0,20$ %, * $p < 0,001$; HU-210 D2: $26,31 \pm 0,16$ %, * $p < 0,001$; HU-210 total: $57,92 \pm 0,24$ %, * $p < 0,001$, N=7, n=2639; HU-210+SR141716 D1: $46,92 \pm 0,51$ %, no significativo; HU-210+SR141716 D2: $23,53 \pm 0,32$ %, no significativo; HU-210+SR141716 total: $70,46 \pm 0,48$ %, no significativo, N=4, n=995).

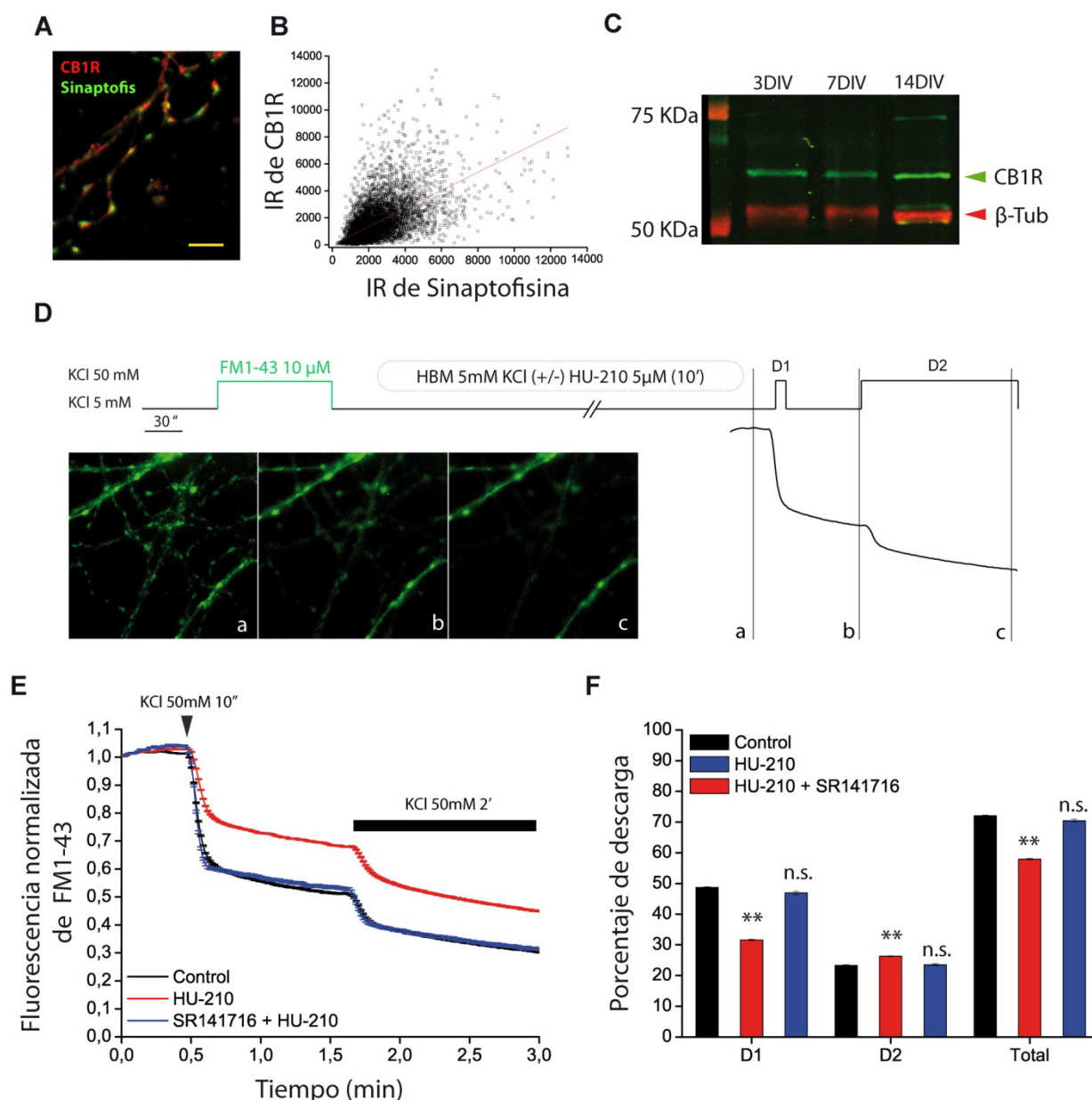


Figura 20- A) Inmunocitoquímica mostrando la colocalización del receptor CB1 con la proteína vesicular sinaptofisina, barra de escala: 5 μ m. B) Se refiere a A; correlación de las inmunorreactividades (IR) de sinaptofisina con las del receptor CB1 en terminales sinápticos de neuronas granulares en cultivo. C) Expresión del receptor en nuestros cultivos a 3, 7 y 14 días *in vitro*. D) Protocolo empleado para los experimentos de FM1-43 e imágenes representativas de la línea base (a), después de la primera descarga (b/D1) y tras la estimulación sostenida con cloruro potásico (c/D2). E) Cinéticas de descarga de FM1-43 en control, HU-210 y HU-210/SR141716. F) Cuantificación de los datos de descarga en los distintos puntos del experimento (* $p < 0,001$; n.s. no significativo, ANOVA con Bonferroni)

En una serie de experimentos paralelos, se observó que la reducción exocitótica observada era estrictamente dependiente de un largo periodo de incubación con el agonista cannabinoide, pues una exposición de 40 segundos al HU-210 no fue suficiente para mediar ningún efecto sobre la descarga de FM1-43 inducida por un periodo de 10 segundos de perfusión hipercalémica (Figura 21A y 21B; Control: $42,42 \pm 0,25$ %; N=5, n=3041; HU-210 [40"]: $41,58 \pm 0,32$; N=5, n=2648, no significativo, ANOVA con Bonferroni).

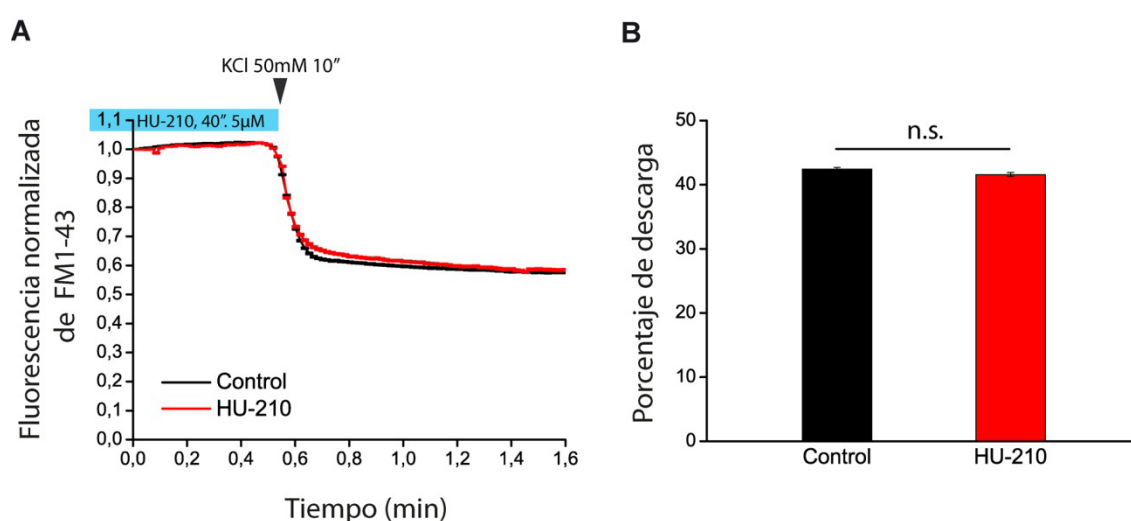
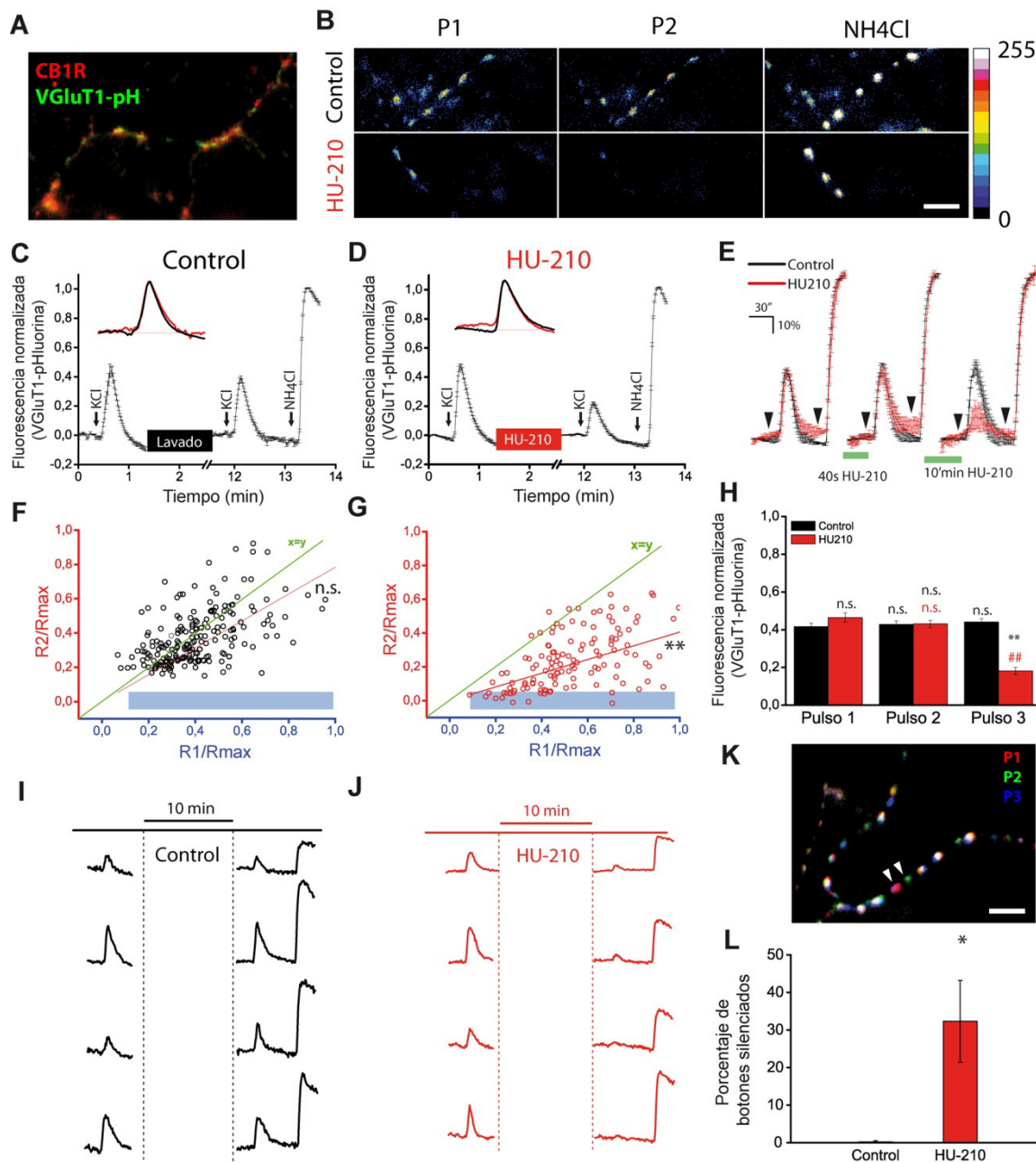


Figura 21- A) Cinéticas de descarga de FM1-43 en control y tras la perfusión de HU-210 durante 40 segundos (rectángulo azul). B) Cuantificación de los porcentajes de descarga (medias de respuestas individuales) de las cinéticas promediadas en A, (* $p < 0,001$; n.s. no significativo, ANOVA con Bonferroni)

Dado que la principal limitación metodológica de los experimentos con FM1-43 es la estimulación necesaria para la incorporación de la sonda en el interior de las vesículas sinápticas y que durante este periodo podría producirse una liberación de endocannabinoides que afectase a los datos contenidos en las figuras 20 y 21, decidimos trasladar estos protocolos experimentales a técnicas de imagen del ciclo vesicular en las que no fuese requerida una estimulación previa para el marcaje de las vesículas sinápticas. Se empleó para ello la VGluT1-pHluorina (amablemente cedida por los

doctores Robert Edwards y Susan Voglmaier, de la UCSF), un copia modificada del transportador vesicular de glutamato 1 (VGluT1) con una GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*) unida a su porción luminal. Las fluctuaciones de pH que tienen lugar en el interior de la vesícula sináptica de forma paralela a los fenómenos de exo/endocitosis nos permiten monitorizar dichos procesos por las variaciones en la fluorescencia de la GFP unida al transportador de glutamato, orientada hacia la cara luminal de las vesículas sinápticas ($\text{pH}_{\text{reposo}}=5,5 \leftrightarrow \text{pH}_{\text{exocitosis}}=7,4$), pues la fluorescencia de la GFP se encuentra apagada a pHs ácidos. Para llevar a cabo una estimación de la fracción de vesículas movilizadas durante un determinado proceso excitotico, al finalizar el experimento se realiza una perfusión de cloruro amónico (NH_4Cl 50mM) con objeto de alcalinizar todas las vesículas, lo que rinde una señal máxima de fluorescencia que se empleará para normalizar y a la que se le conferirá el valor 1 (a la línea base del experimento se le confiere el valor 0). Las ventajas principales de esta técnica son I) la ausencia de estimulación previa a la realización del experimento, y por tanto de la activación de la síntesis de endocannabinoides que ello podría conllevar; II) la posibilidad de monitorizar registros endocitóticos y III) la presencia de un control interno para cada una de las respuestas sinápticas individuales si se llevan a cabo protocolos de varias estimulaciones.

→ **Figura 22-** A) Colocalización del receptor CB1 con VGluT1-pHluorina en células transfectadas a 0 DIV y mantenidas hasta 7 DIV para el análisis de las respuestas .B) Ejemplo ilustrativo de las medias mostradas en C y D, obsérvese la reducción de fluorescencia en el segundo pulso tras el tratamiento de 10 minutos con HU-210. Medias cinéticas en condiciones control (C) y con un tratamiento intermedio de HU-210 (D), la normalización (0,1), empleada para la comparación de respuestas cinéticas se muestra en la figuras insertadas. E) Experimentos de triple pulso en los que se muestra que solo las incubaciones prolongadas con el agonista cannabinoide producen una reducción excitotica observable, los tiempos entre estimulaciones son 10 minutos en todos los casos.



F y G) son las correlaciones de las respuestas individuales, en control y tras la aplicación de 10 minutos de HU-210. Los recuadros azules indican una respuesta inferior al 4% en el segundo pulso (sinapsis silenciadas), la línea verde es $x=y$ y las líneas rojas el ajuste de los datos experimentales. H) Cuantificación de las medias mostradas en E, obsérvese que sólo los tiempos largos de incubación generan una reducción excitotóxica (pulso 3). I y J) son registros individuales de sinapsis en control (I) y tras el tratamiento con HU-210 (J). K) Superposición de imágenes obtenidas durante la perfusión de NH_4Cl en cada uno de los pulsos de E, obsérvese que algunos botones sinápticos se desplazaban en su totalidad durante la realización del experimento (puntas de flecha) y por tanto no fueron cuantificados. L) Porcentaje de sinapsis silenciadas (cuadro azul en G) tras el tratamiento con HU-210 (n.s. no significativo; * $p<0,05$; ** o ## $p<0,01$).

Tras comprobar la presencia del receptor en terminales de neuronas transfectadas por su colocalización con GFP (Figura 22A), se comprobó que, en condiciones control, dos estimulaciones sucesivas de 10s con HBM de estimulación, espaciadas por un intervalo de 10 minutos, daban lugar a respuestas exocitóticas de la misma magnitud, lo que descartaba la posibilidad de que se estuvieran produciendo mecanismos de depresión/potenciación presináptica durante este intervalo de tiempo (Figura 22C, Control, Pulso 1: $42,82 \pm 1,77$ %; Pulso 2: $39,15 \pm 1,35$ %, N=6, n= 209, no significativo). Al aplicar el agonista cannabinoide (HU-210, 5 μ M) en los 10 minutos del intervalo entre estímulos se producía una marcada reducción exocitótica de las respuestas globales (Figura 22 D; HU-210, Pulso 1: $48,26 \pm 2,06$ %; Pulso 2: $23,11 \pm 1,24$ %, N=6, n=195, $^{**}p<0,01$) sin efecto aparente en las cinéticas de exo/endocitosis (figuras insertadas en 22C y 22D). Con objeto de corroborar el requerimiento de una exposición prolongada al agonista cannabinoide para inducir la reducción exocitótica, se diseñaron experimentos de triple pulso, en los que el intervalo entre estimulaciones era de 10 minutos. Estos intervalos fueron empleados para analizar los efectos de las exposiciones a corto (40") y largo plazo (10') con el agonista HU-210, comprobándose que solo las incubaciones durante periodos prolongados de tiempo inducen una reducción de la exocitosis vesicular sináptica (Figura 22E y 22H: Control P1: $41,67 \pm 1,81$ %; Control P2: $42,82 \pm 1,83$, no significativo; Control P3: $44,11 \pm 1,78$ %, no significativo; N=2, n=90// HU-210 P1 (Control): $46,44 \pm 2,42$, no significativo; HU-210 P2 (40"): $43,10 \pm 1,93$, no significativo; HU-210 P3 (10'): $18,12 \pm 1,88$, $^{**}p<0,01$ y $^{##}p<0,01$, comparado a P1 control y P1 HU-210 respectivamente; N=2, N=49; ANOVA con Bonferroni en todos los casos). Encontramos que tras los 10 minutos de incubación con HU-210 se producía un fenómeno conocido como silenciamiento sináptico en una subpoblación de terminales (Cuadro azul en figura 22G, ejemplos individuales en 22B y

22J) definiendo como ausencia de exocitosis una respuesta inferior al 4% sobre la señal máxima de fluorescencia (por ser estos los niveles habituales de ruido en los registros individuales), fenómeno que no se observó en condiciones control. Definimos como botones silenciados por el tratamiento con HU-210 aquellos que mostraban una respuesta exocitótica normal durante el primer pulso, pero inferior al 4% durante la segunda estimulación (Figura 22L; Control: $0,25 \pm 0,25$ % de botones silenciados; HU-210: $32,31 \pm 10,86$ % de botones silenciados, $*p < 0,05$ Prueba t de Student).

13- Independencia de Calcio del fenómeno de silenciamiento sináptico

Los resultados obtenidos en los experimentos de FM1-43, en los que una estimulación sostenida con solución hipercalémica no era capaz de compensar los mecanismos de inhibición iniciados por el HU-210, apuntaban hacia un tipo de inhibición calcio independiente, ya que a estas intensidades de estimulación, la regulación de la neurosecreción por nanodominios de calcio parece no ser efectiva. En primera instancia corroboramos la calcio dependencia de los procesos exocitóticos y endocitóticos en nuestro sistema experimental; para ello realizamos estimulaciones pareadas (protocolos de doble pulso) a concentraciones crecientes de calcio durante el periodo de estimulación (0,25mM, 1,33mM y 5mM CaCl_2). Se comprobó que el incremento máximo de fluorescencia (número de vesículas exocitadas) era directamente proporcional a la concentración de calcio empleada durante el periodo de estimulación (Figura 23A y 23B, 0,25mM CaCl_2 : $31,20 \pm 2,22\%$, N=3, n= 64, $**p < 0,01$; 1,33mM CaCl_2 : $42,47 \pm 4,77\%$, N=7, n=209; 5mM CaCl_2 : $56,94 \pm 4,17\%$, N=5, n=101, $**p < 0,01$, ANOVA con Bonferroni, comparaciones con 1,33mM CaCl_2). En cuanto a las constantes temporales de exocitosis, estas no sufrieron modificaciones a ninguna de

las concentraciones de calcio de forma significativa (Figura 23C; 0,25mM CaCl_2 : $5,51 \pm 0,50$ segundos, no significativo; 1,33mM CaCl_2 : $4,61 \pm 0,55$ segundos; 5mM CaCl_2 : $6,33 \pm 0,87$ segundos, no significativo; Prueba t de Student comparado con 1,33mM CaCl_2).

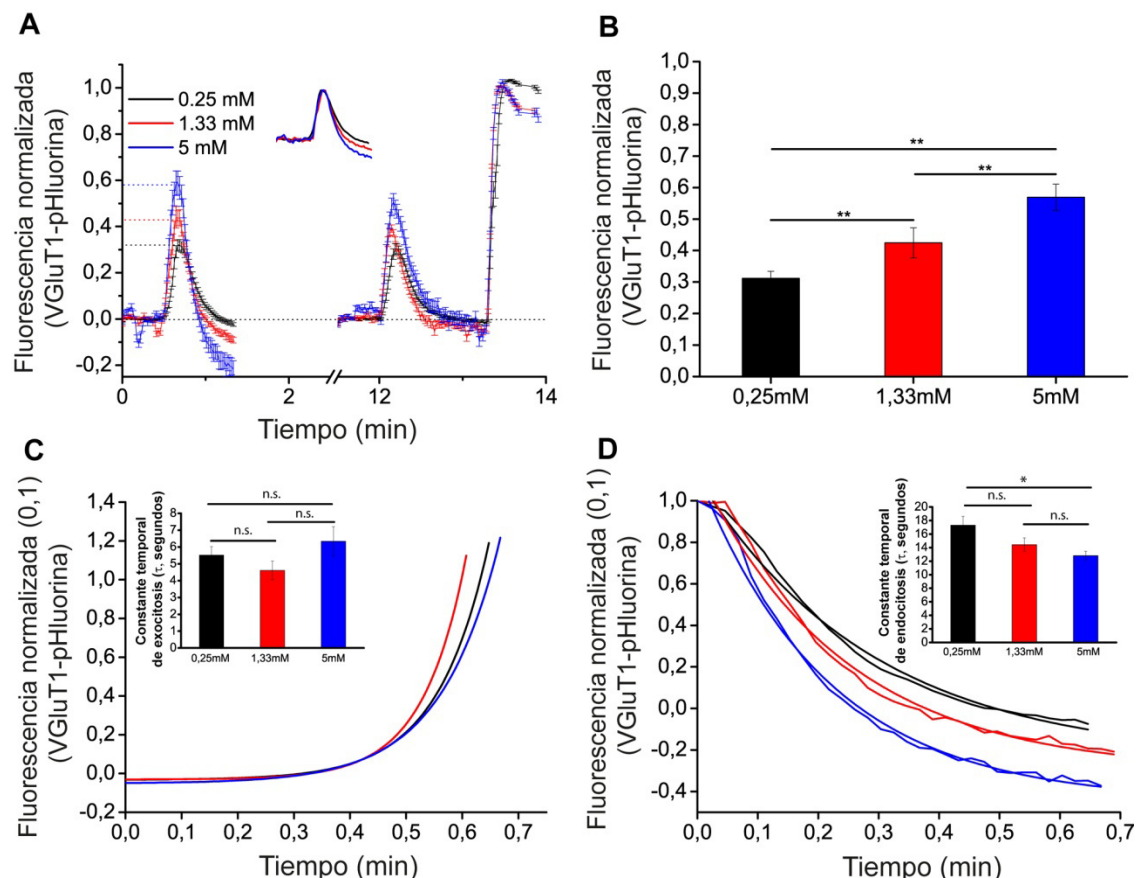


Figura 23- A) Medias cinéticas obtenidas en experimentos de doble pulso a concentraciones crecientes de calcio, la figura insertada es la normalización (0,1) para el análisis de parámetros cinéticos. B) Cuantificación de los incrementos medios de fluorescencia del primer pulso para cada concentración de calcio, media a partir de datos individuales. C y D) Ajustes exponenciales de exocitosis y endocitosis, respectivamente, con las comparaciones de sus constantes temporales en las figura insertadas (n.s., no significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA con Bonferroni en B y Prueba t de Student en C y D).

Las constantes endocitóticas mostraron una clara tendencia a la reducción (aumento de la velocidad del proceso de endocitosis) a medida que se aumentaron las concentraciones de calcio, siendo únicamente significativa la comparación entre 0,25mM y 5mM CaCl_2 (Figura 23D; 0,25mM CaCl_2 : $17,30 \pm 1,30$ s, no significativo; 1,33mM CaCl_2 : $14,43 \pm 0,98$; 5mM CaCl_2 : $12,81 \pm 0,64$ s, no significativo versus 1,33mM; $*p < 0,05$ versus 5mM). Una vez caracterizada la calcio-dependencia del proceso exo/endocitótico en nuestro sistema, decidimos llevar a cabo la inducción del silenciamiento por exposición al agonista cannabinoide HU-210 en experimentos de doble pulso en los que se empleó una concentración de 5mM CaCl_2 durante los pulsos de estimulación. Los efectos observados a concentraciones fisiológicas de calcio se reprodujeron a 5mM CaCl_2 , tanto en lo referente a la magnitud global de la respuesta exocitótica (Figuras 24A, 24B y 24C; Control P1: $53,51 \pm 4,08$ %; Control P2: $45,36 \pm 3,14$ %; N=3, n=49, no significativo; HU-210 P1: $39,49 \pm 1,96$ %; HU-210 P2: $13,35 \pm 1,03$ %; N=4, n=86, $**p < 0,01$; Prueba t de Student contra su control interno [P1] en ambos casos) como en lo referente al porcentaje de botones silenciados tras el tratamiento con HU-210 (Figura 24D; Control 1,33mM: $0,25 \pm 0,25$ %; HU-210 1,33mM: $32,31 \pm 10,86$ %, $*p < 0,05$; Control 5mM: $1,41 \pm 0,81$ no significativo; HU-210 5mM: $25,61 \pm 5,35$ %, $*p < 0,05$; ANOVA con Bonferroni, datos de 1,33mM tomados de figura 22L), lo que indica que un aumento de la concentración extracelular de calcio (y por tanto de la entrada de calcio durante la estimulación) no es suficiente para prevenir los efectos inhibitorios mediados por el HU-210. Puesto que a altas concentraciones de calcio los experimentos de dobles pulso podrían estar induciendo fenómenos de depresión a largo plazo (obsérvese en el control una ligera tendencia no significativa a la reducción exocitótica durante el segundo pulso de estimulación), decidimos llevar a cabo estos experimentos con un solo pulso de estimulación a una

concentración de calcio de 5mM. Con objeto de eludir los mecanismos de inhibición de la entrada de calcio se llevaron a cabo estimuciones de 20 segundos con cloruro potásico.

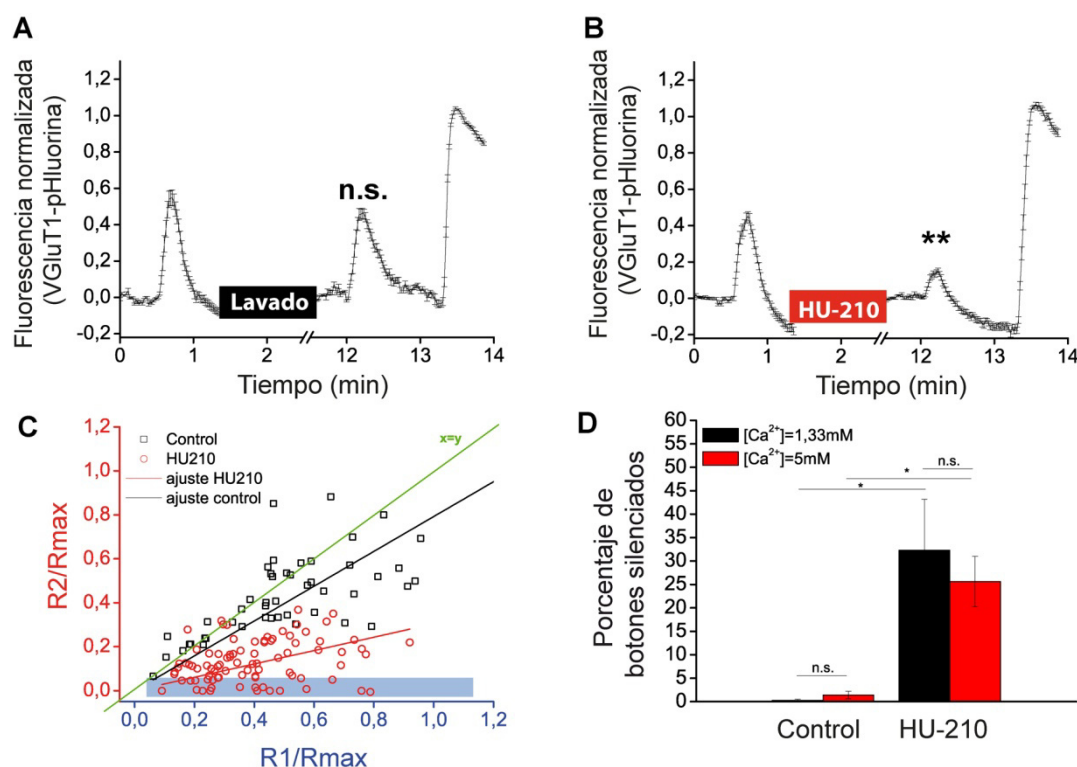


Figura 24- Experimentos de doble pulso a 5mM CaCl₂ en control (A) y tras la aplicación de HU-210 5μM entre ambos pulsos (B), la correlación de las respuestas individuales se muestra en C). D) Comparación del porcentaje de botones silenciados a concentración fisiológica de calcio (1,33mM, datos de figura 22L) y a concentración elevada de calcio (5mM), n.s. no significativo; *p<0,05; **p<0,01; Prueba t de Student en A y B, ANOVA con Bonferroni en D).

Los experimentos de pulso simple a altas concentraciones de calcio corroboraron los resultados obtenidos en experimentos de pulso simple y demostraron que la estimulación previa con una concentración suprafisiológica de calcio no estaba

implicada en el fenómeno de silenciamiento. Se observó una marcada reducción exocitótica (Figuras 25A, 25B y 25C; Control 5mM CaCl_2 : $56,92 \pm 1,93$ %, $N=5$, $n=157$; HU-210 5mM CaCl_2 : $28,98 \pm 1,36$ %, $N=5$, $n=134$), acompañada de una inducción de silenciamiento sináptico comparable a la obtenida en los experimentos de doble pulso (Figura 25 F; Control 5mM: $0,80 \pm 0,52$ % de sinapsis silentes; HU-210 5mM: $19,76 \pm 4,19$ % de sinapsis silentes, $**p<0,01$ Prueba t de Student). Se encontró un defecto endocitótico en el control que se rescataba en el tratamiento con HU-210, probablemente debido a una saturación de la maquinaria endocitótica a estas concentraciones de calcio en el control que tendría lugar como consecuencia de la exocitosis masiva que este tipo de estimulación acarrea (Dittman y Ryan, 2009), si bien es cierto que, aunque evidente, esta tendencia no mostró significación estadística (Figuras 25D y 25E, Control 5mM CaCl_2 , τ endocitosis: $44,52 \pm 6,25$ s; HU-210 5mM CaCl_2 , τ endocitosis: $25,26 \pm 6,44$ s, no significativo, Prueba t de Student). Puesto que este tipo de estimulación masiva no fue capaz de ocluir la inhibición exocitótica mediada por el HU-210, es posible que el efecto neto ejercido por el HU-210 sea dissociable, en gran medida, de la inhibición de los canales de calcio voltaje dependientes mediado por la activación del receptor CB1. Existe descrita una oclusión del efecto potenciador del PDBu a concentraciones altas de calcio (Lou *et al.*, 2005). La oclusión de esta potenciación en nuestro modelo sería un dato experimental del que se argüiría que la inhibición mediada por el HU-210 no sería explicable únicamente como una inhibición de la entrada de calcio. Motivados por esta hipótesis decidimos llevar a cabo experimentos de doble pulso en el que el análogo del DAG, el Forbol-12, 13-dibutirato (PDBu), era perfundido durante 5 minutos en el intervalo entre estimulaciones. Se observó una oclusión de la potenciación ejercida por el PDBu a concentraciones fisiológicas de calcio.

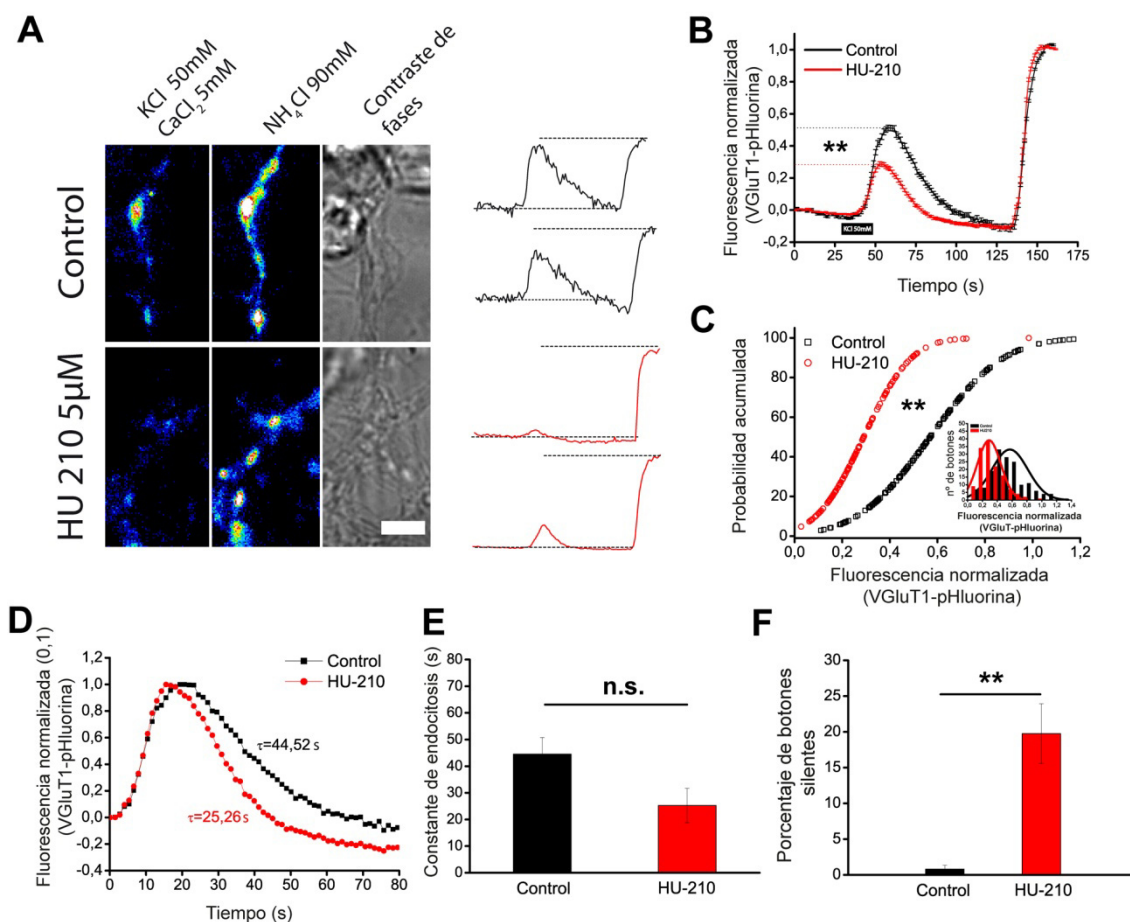


Figura 25- A) Imágenes representativas de un experimento de un solo pulso a concentración 5mM CaCl₂, en control (parte superior y trazos negros) y tras el tratamiento con HU-210 (parte inferior y trazos rojos). Se muestran las imágenes de contraste de fases en la columna de la derecha. B) Medias globales de las respuestas en control (negro) y tras el tratamiento con HU-210. En C) se muestra la distribución de probabilidad acumulada del porcentaje de descarga para cada uno de los grupos, el histograma y la gaussiana derivada de su ajuste se representan en la figura insertada. D) Normalización (0,1) para el cálculo de parámetros cinéticos, las constantes promedio de endocitosis se muestran en E). F) Porcentaje de botones silentes a 5mM CaCl₂ en control y tras el tratamiento con HU-210. n.s., no significativo; **p<0,01. ANOVA con Bonferroni de las respuestas individuales en B); K-S test en C); Prueba t de Student en E y en F.

La potenciación selectiva del PDBu sobre las respuestas sinápticas a bajas concentraciones de calcio (0,25mM) se manifestó en un incremento del cociente obtenido al dividir la respuesta obtenida tras la perfusión del PDBu entre la respuesta control (Figura 26D y 26G; Cociente de respuestas R2/R1; Control 1,33mM CaCl₂: 0,95 ± 0,92 N=5, n=142; PDBu 1,33mM CaCl₂: 0,99 ± 0,01, n.s.; Control 0,25mM CaCl₂: 0,97 ± 0,05, n.s. (versus Control 1,33mM); PDBu 0,25mM CaCl₂: 3,01 ± 0,31, **p<0,01; ##p<0,01, ANOVA con Bonferroni contra el control a ambas concentraciones de calcio respectivamente). Se observaron fenómenos opuestos a la inducción de silenciamiento, en los que tras la perfusión de PDBu se reclutaban sinapsis previamente inactivas (Figura 26A y 26E); sin embargo, las bajas concentraciones de calcio no son óptimas para evaluar el silenciamiento sináptico, pues a bajas intensidades de estimulación el silenciamiento sináptico se puede ver enmascarado por la disminución global de la probabilidad de liberación (Cousin y Evans, 2011) motivo por el cual no se analizó este efecto en esta serie de experimentos (Figura 26B, registros individuales y cuadrado azul en figura 26E). Al analizar el ajuste de las respuestas individuales enfrentadas (Control 1,33mM CaCl₂: pendiente = 0,90 ± 0,01; r² = 0,92; PDBu 1,33mM CaCl₂: pendiente = 0,95 ± 0,01; r² = 0,93, no significativo; Control 0,25mM CaCl₂: pendiente = 0,96 ± 0,04; r² = 0,91, no significativo vs. control 1,33mM CaCl₂; PDBu 0,25mM CaCl₂: pendiente = 1,38 ± 0,04; r²: 0,80, **p<0,01, ##p<0,01, vs. Control a 1,33mM y 0,25mM CaCl₂, respectivamente), únicamente en el caso del PDBu a 0,25mM CaCl₂ se encontró una pendiente significativamente superior a la recta x=y (línea verde). Estos datos confirman que la modulación de la eficacia sináptica por PDBu se ve ocluida a concentraciones fisiológicas de calcio en nuestro sistema, lo cual es un argumento a favor de la calcio independencia, al menos parcial, de la inhibición mediada por la activación del receptor CB1R.

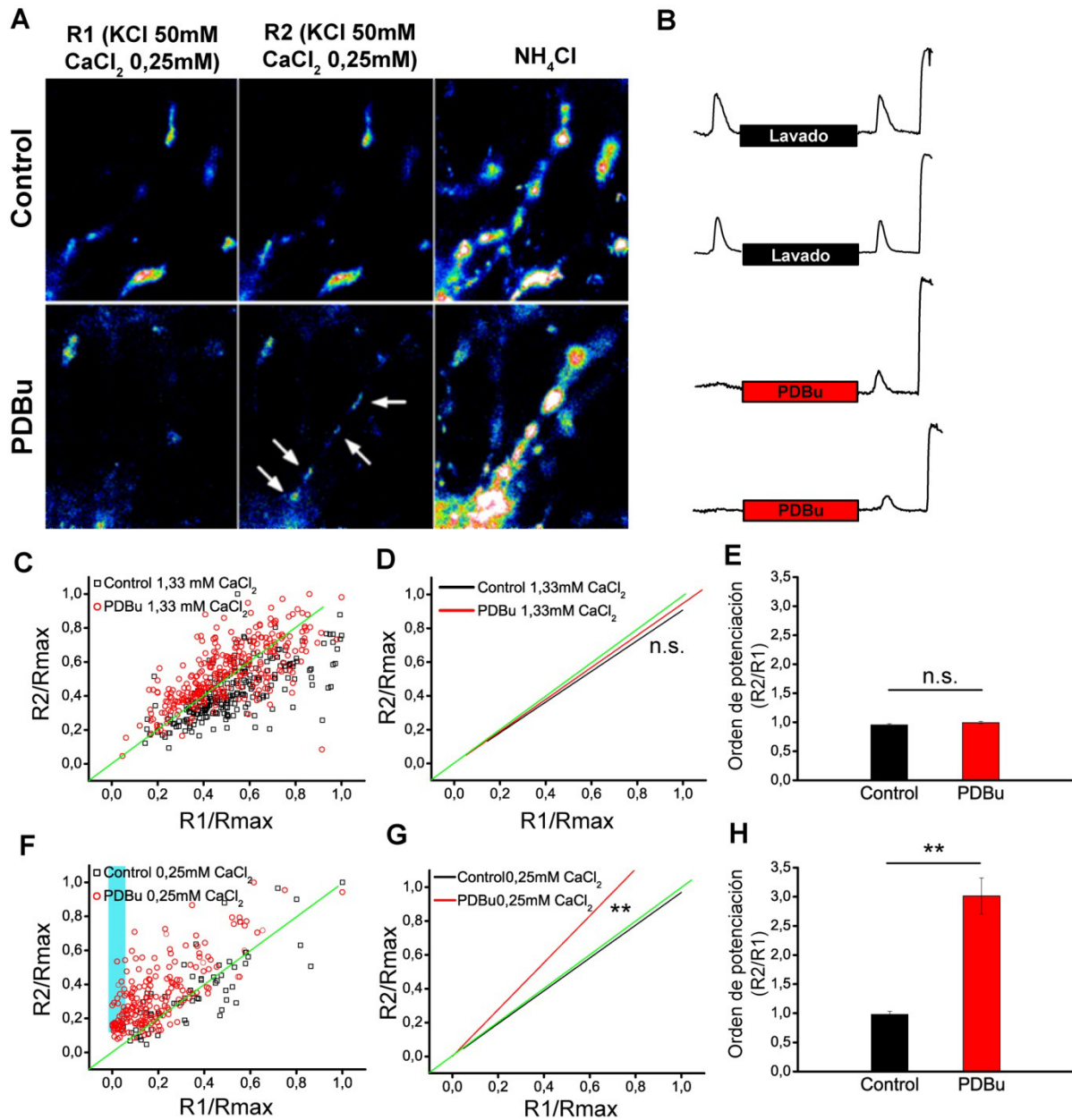


Figura 26- A) Imágenes representativas de un experimento de doble pulso a bajas concentraciones (0,25mM) de calcio, las flechas indican sinapsis reclutadas tras la perfusión de PDBu. B) Registros individuales en experimentos de doble pulso. C, D y E) Registros individuales enfrentados (R1 vs. R2), ajuste de las respuestas enfrentadas y orden de potenciación, respectivamente, a 1,33mM CaCl₂ en control, negro y en PDBu, rojo. F, G y H) Registros individuales enfrentados (R1 vs. R2), ajuste de las respuestas enfrentadas y orden de potenciación, respectivamente, a 0,25mM CaCl₂ en control, negro y en PDBu, rojo, n.s., no significativo; **p<0,01. Prueba t de Student en D y G; ANOVA con Bonferroni en E y H.

Finalmente, con objeto de corroborar la calcio independencia de la inhibición exocitótica mediada por el HU-210 se llevaron a cabo experimentos con un indicador ratiométrico de calcio, la sonda FURA-2 AM. Estos experimentos fueron diseñados para llevar a cabo estimulaciones sucesivas (50mM KCl, 10s) sobre las mismas neuronas, intercalando entre los estímulos, bien una perfusión con medio de lavado o bien una perfusión de distintos tiempos (1 minuto o 10 minutos) con HU-210. Encontramos una reducción similar de la entrada de calcio en ambos tiempos de incubación con HU-210, que no fue observada en condiciones control (Figura 27 Control R1: $1,07 \pm 0,05$; Control R2: $1,00 \pm 0,05$; no significativo, $n=739$; HU-210 1 min R1: $1,51 \pm 0,02$; HU-210 1 min R2: $1,18 \pm 0,02$, $**p<0,01$, $n=771$; HU-210 10 min R1: $1,34 \pm 0,03$; HU-210 10 min R2: $0,94 \pm 0,02$, $**p<0,01$, $n=336$, Prueba t de Student) puesto que solo aquellos tratamientos prolongados con el HU-210 dan lugar a una reducción exocitótica significativa, concluimos que los efectos sobre la exocitosis mediados por la activación del receptor CB1 son dissociables de la inhibición de la entrada de calcio.

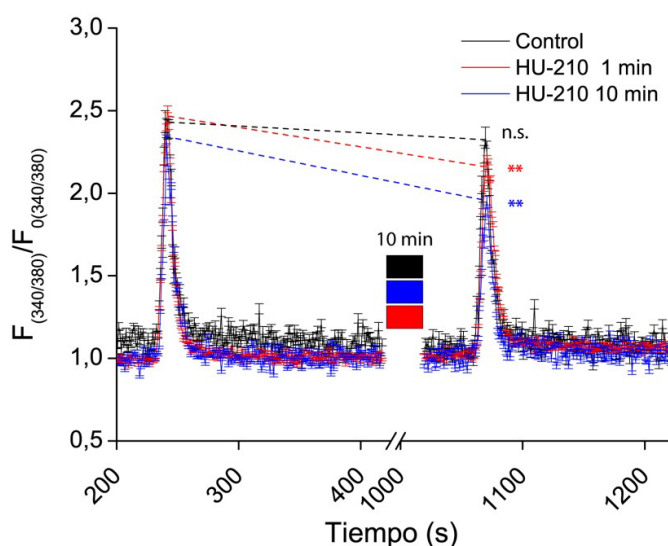


Figura 27- Experimento de doble pulso con el indicador de calcio FURA-2 AM. La entrada de calcio se inhibió de forma similar en tratamientos cortos y prolongados con HU-210. n.s. no significativo; $**p<0,01$, Prueba t de Student.

14- Efectos ultraestructurales asociados a la activación del receptor CB1

Puesto que la inhibición mediada por el HU-210 no parece ser exclusivamente atribuible a una inhibición de la entrada de calcio, decidimos analizar si la aplicación del agonista cannabinoide daba lugar a algún tipo de defecto posicional sobre las vesículas sinápticas, que pudiese estar influyendo en la disponibilidad de las mismas y el acoplamiento de la exocitosis a la entrada de calcio. Con el objeto de caracterizar ultraestructuralmente, mediante microscopía electrónica de transmisión, el efecto mediado por el HU-210, se diseñaron una serie de experimentos en los que las células se trataron durante 10 minutos bien con medio de lavado, o con medio que contenía HU-210 5 μ M. Posteriormente las células se fijaron y procesaron para su análisis mediante microscopía electrónica. Encontramos que el tratamiento con HU-210 no producía ninguna modificación en el número de vesículas totales medias en los terminales de neuronas granulares en cultivo (Figuras 28E; Control: 30 ± 2 SVs/sinapsis; HU-210: 34 ± 3 SVs/sinapsis, no significativo, Prueba t de Student) lo que permitió el análisis porcentual de la posición de las vesículas sinápticas respecto a la zona activa. Se identificó una retracción de las vesículas en los botones de las neuronas tratadas con HU-210 (Figura 28A, parte superior y 28B; Porcentaje de vesículas a menos de 10 nm de la membrana presináptica, Control: $14,31 \pm 0,78$ %, n=38; HU-210: $5,78 \pm 0,67$ %, n=44, $**p<0,01$ Prueba t de Student. Número medio de vesículas a menos de 10 nm de la zona activa, Control: $4,0 \pm 0$ SVs/sinapsis, n =38; HU-210: $2,0 \pm 0$ SVs/ sinapsis, n=44, $**p<0,01$, Prueba t de Student). Tratando de corroborar este efecto en un sistema biológico distinto decidimos reproducir este experimento en sinaptoneurosomas de corteza cerebral de ratón; estos muestran la ventaja de ser extraídos del tejido nativo y de permitirnos la caracterización de los efectos del HU-210 en animales carentes del gen del receptor CB1.

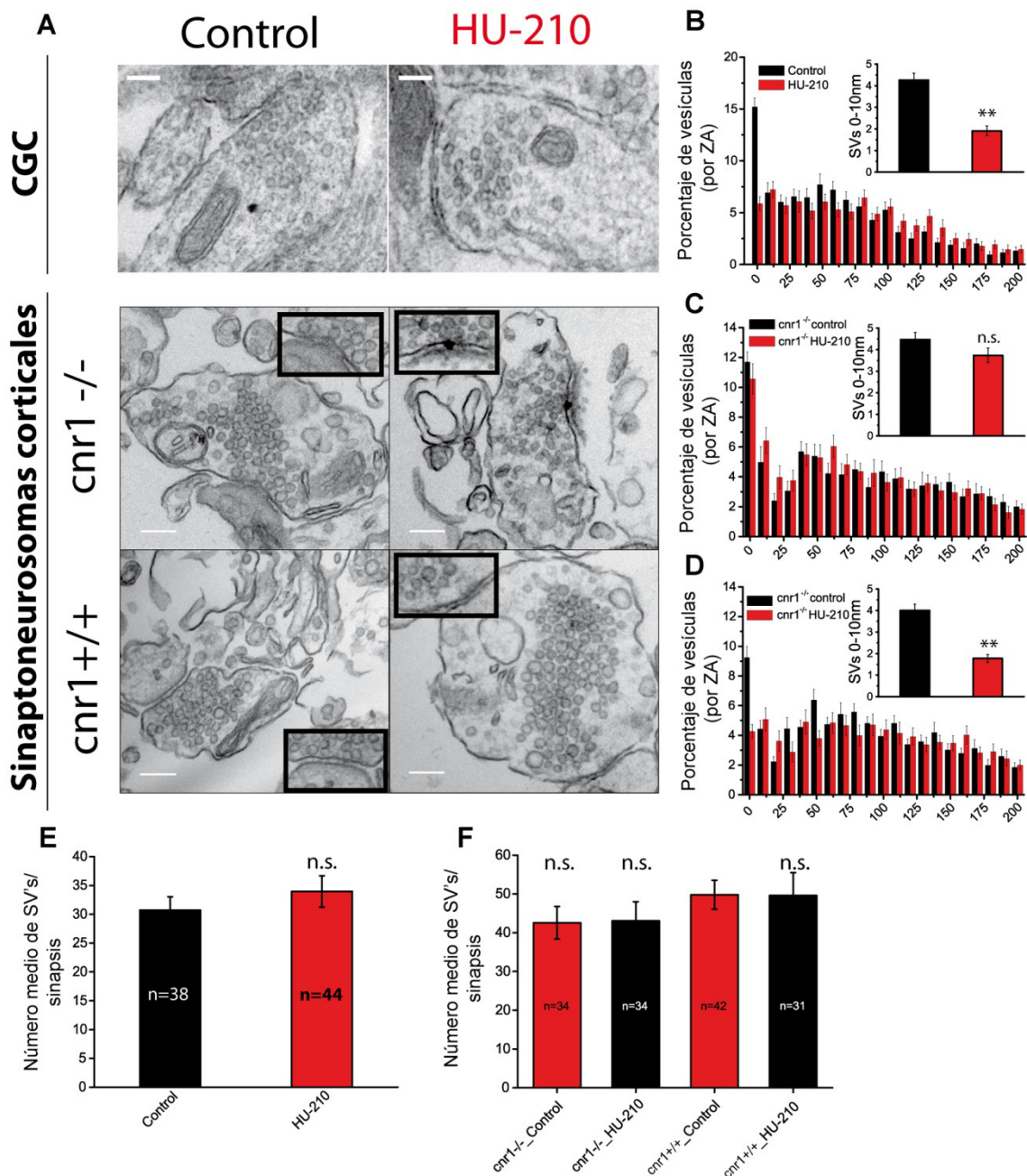


Figura 28- A) Imágenes representativas de la disposición de las SVs en control y tras el tratamiento con HU-210 en células granulares de cerebelo, (escala 100nm, fila superior), en sinaptoneurosomas provenientes de ratones carentes del receptor CB1R ($cnr1^{-/-}$, escala 150nm, fila media) o en sinaptoneurosomas de ratones silvestres ($cnr1^{+/+}$, escala 150nm, fila inferior). Cuantificaciones del porcentaje de vesículas por zona activa en función de la distancia y (en figuras insertadas) número medio de vesículas a menos de 10 nm en células granulares de cerebelo (B), en sinaptoneurosomas de ratones $cnr1^{-/-}$ (C) o en sinaptoneurosomas de ratones $cnr1^{+/+}$ (D), en control (negro) y tras el tratamiento con HU-210 (rojo). E) y F) son cuantificaciones del número medio de vesículas por terminal en células granulares de cerebelo y en sinaptoneurosomas corticales, respectivamente. n.s. no significativo; ** $p < 0,01$; Prueba t de Student.

El defecto en posicionamiento de las vesículas sinápticas encontrado en células granulares de cerebelo se reprodujo en sinaptoneurosomas provenientes de corteza cerebral de ratones genéticamente normales (Figura 28A filas media e inferior, 28C y 28D, Sinaptoneurosomas $cnr1^{+/+}$; Porcentaje de vesículas a menos de 10 nm, Control: $9,24 \pm 0,75$ %, $n=42$; HU-210: $4,27 \pm 0,46$ %, $n=31$, $**p<0,01$ Prueba t de Student; Número medio de vesículas a menos de 10 nm; Control: $4,0 \pm 0$; HU-210: $2,0 \pm 0,0$, $**p<0,01$ Prueba t de Student; Sinaptoneurosomas $cnr1^{-/-}$; Porcentaje de vesículas a menos de 10nm, Control: $11,70 \pm 0,77$, $n=34$; HU-210: $10,56 \pm 1,01$, $n=34$, $p<0,05$, Prueba t de Student; Número medio de vesículas a menos de 10 nm; Control: $4,0 \pm 0,0$; HU-210: $4,0 \pm 0,0$, $p>0,05$ Prueba t de Student). El número medio de vesículas sinápticas por sinapsis analizada no se vio modificado ni por los tratamientos, ni por las características genéticas de los ratones (Figura 28F, Número medio de vesículas/zona activa: $cnr1^{+/+}$ Control: 50 ± 4 ; $cnr1^{+/+}$ HU-210: 50 ± 6 , no significativo; $cnr1^{-/-}$ Control: 43 ± 4 , no significativo; $cnr1^{-/-}$ HU-210: 43 ± 5 , no significativo, ANOVA con Bonferroni). Estos resultados junto con la calcio independencia parcial de la inhibición de la entrada de calcio que exhibe este tipo de depresión sináptica, indican que el efecto inhibitorio del HU-210 es atribuible a una redistribución del aparato vesicular sináptico.

15- La activación del receptor CB1 induce una reducción del *pool* de reciclamiento

Tratando de evaluar si los datos ultraestructurales eran paralelos a una redistribución de las vesículas sinápticas en los distintos *pools* de vesículas, se llevaron a cabo experimentos en los que se analizaba de forma acumulativa la exocitosis sináptica desencadenada por una estimulación. Para ello se usó la bafilomicina, un inhibidor de la V-ATPasa que impide la re-acidificación de las vesículas que tiene lugar tras la

endocitosis. Esto permite que todas las vesículas que se hayan fusionado con la membrana presináptica durante un periodo de estimulación (*pool* de reciclamiento), emitan una señal fluorescente a pesar de haberse endocitado, pues al no ser posible su re-acidificación, tampoco se observa un apagamiento de la fluorescencia de la VGluT1-pHluorina (Ariel y Ryan, 2010). Se estudiaron dos parámetros en estos experimentos, la fracción correspondiente al *pool* de reciclamiento en control y tras el tratamiento con HU-210 a distintas concentraciones de calcio (0,25mM; 1,33mM y 5mM), y el porcentaje de respuestas silentes en cada una de estas concentraciones de calcio. Encontramos una reducción significativa del *pool* de reciclamiento tras el tratamiento con HU-210 a todas las concentraciones de calcio ensayadas, así como un aumento del número de botones silentes. La fracción de vesículas correspondiente al *pool* de reciclamiento a las distintas concentraciones de calcio fue la siguiente (Figura 29 y 30B; 0, 25mM CaCl₂, Control: $16,03 \pm 0,89$ %, N=3, n=193; HU-210: $7,33 \pm 0,38$ %, N=3, n=379, **p<0,01 ANOVA con Bonferroni; 1,33mM CaCl₂, Control: $31,19 \pm 0,77$ %, N=4, n=402; HU-210: $15,19 \pm 0,63$ %, N=4, n=267, **p<0,01 ANOVA con Bonferroni; 5mM CaCl₂, Control: $36,60 \pm 0,16$ %, N=4, n=607; HU-210: $18,23 \pm 0,90$ %, N=4, n=238, **p<0,01, ANOVA con Bonferroni y K-S Test). El número de botones silentes (definidos en estos experimentos como aquellos cuya señal acumulativa no superaba el 4% sobre la línea base), aumentó de forma drástica tras el tratamiento con HU-210 a todas las concentraciones de calcio (Figura 30A; Porcentaje de botones silentes: 0,25mM CaCl₂, Control: $8,42 \pm 1,36$ %; HU-210: $49,92 \pm 1,20$ %, *p<0,05, Prueba t de Student; 1,33 mM CaCl₂, Control: $1,97 \pm 0,67$ %; HU-210: $19,14 \pm 5,17$ %, *p<0,05 Prueba t de Student; 5mM CaCl₂: Control: $0,97 \pm 0,30$ %; HU-210: $12,32 \pm 3,62$ %, *p<0,05 Prueba t de Student) si bien es cierto que el aumento a 0,25mM fue mucho mayor, de nuevo cabe mencionar que las bajas concentraciones de calcio no son

óptimas para evaluar el silenciamiento sináptico, debido a la disminución global de la probabilidad de liberación.

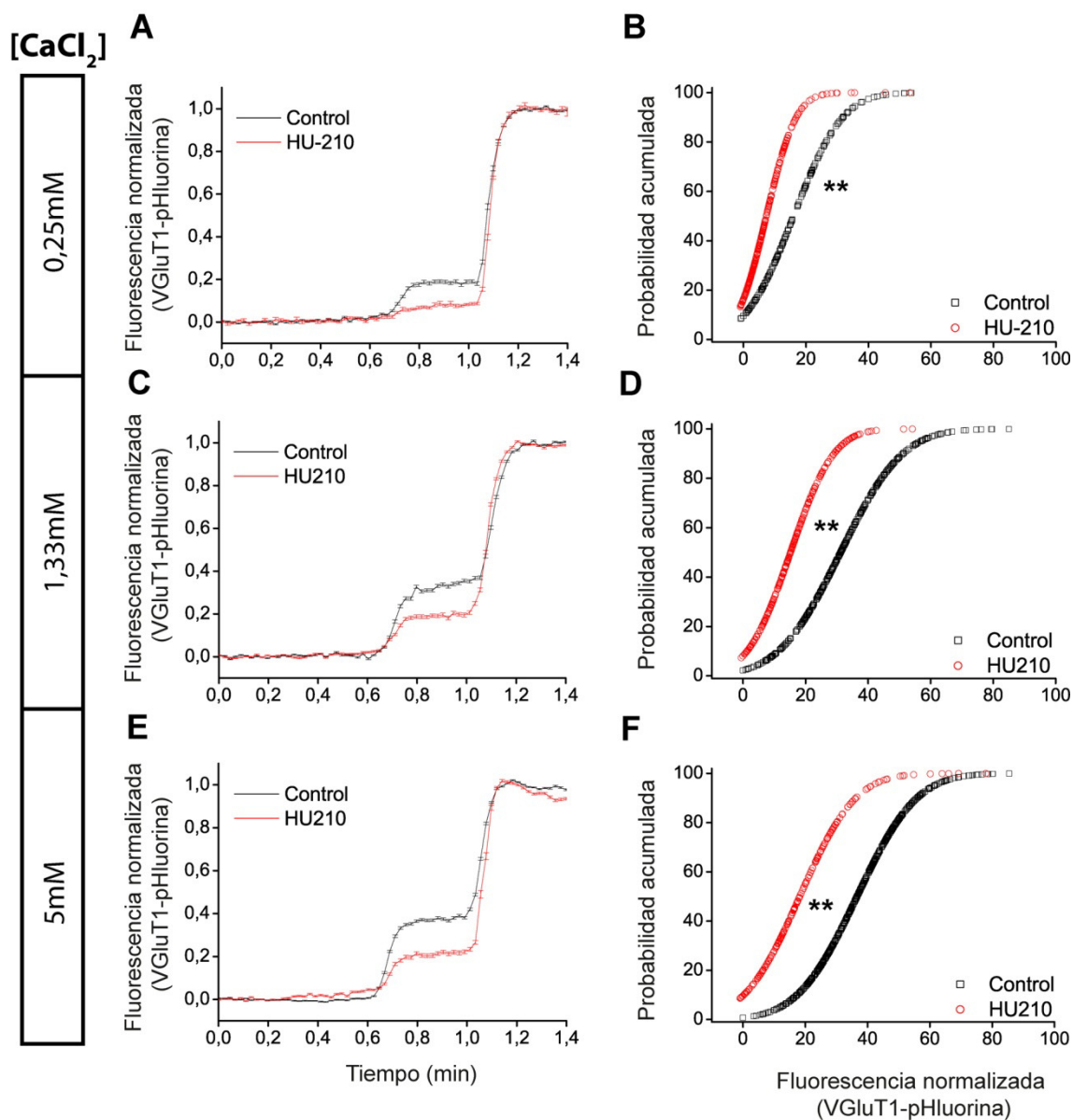


Figura 29- Medias cinéticas obtenidas en experimentos realizados en presencia de bafilomicina a 0,25mM (A), 1,33mM (C) y 5mM $CaCl_2$ (E) respectivamente; obsérvese que la reducción en el *pool* de reciclamiento inducida por el HU-210 fue significativa a todas las concentraciones de calcio ensayadas. En B, D y F) se muestran las distribuciones de probabilidad acumulada de la fracción correspondiente al *pool* de reciclamiento a las distintas concentraciones de calcio, ** $p < 0,01$ Kolmogorov-Smirnov Test

Se puede considerar que el incremento de fluorescencia registrado durante los primeros milisegundos de un experimento realizado en presencia de bafilomicina corresponde al RRP (Neves y Lagnado, 1999; Rizzoli y Betz, 2005). Limitados por la resolución temporal, llevamos a cabo un ajuste lineal (Figura 30; $y=a+mx$; $a=0$) de los primeros tramos de la fase excitotónica, encontrando una reducción de la pendiente tras el tratamiento con el HU-210, que es consistente con los datos de microscopía electrónica.

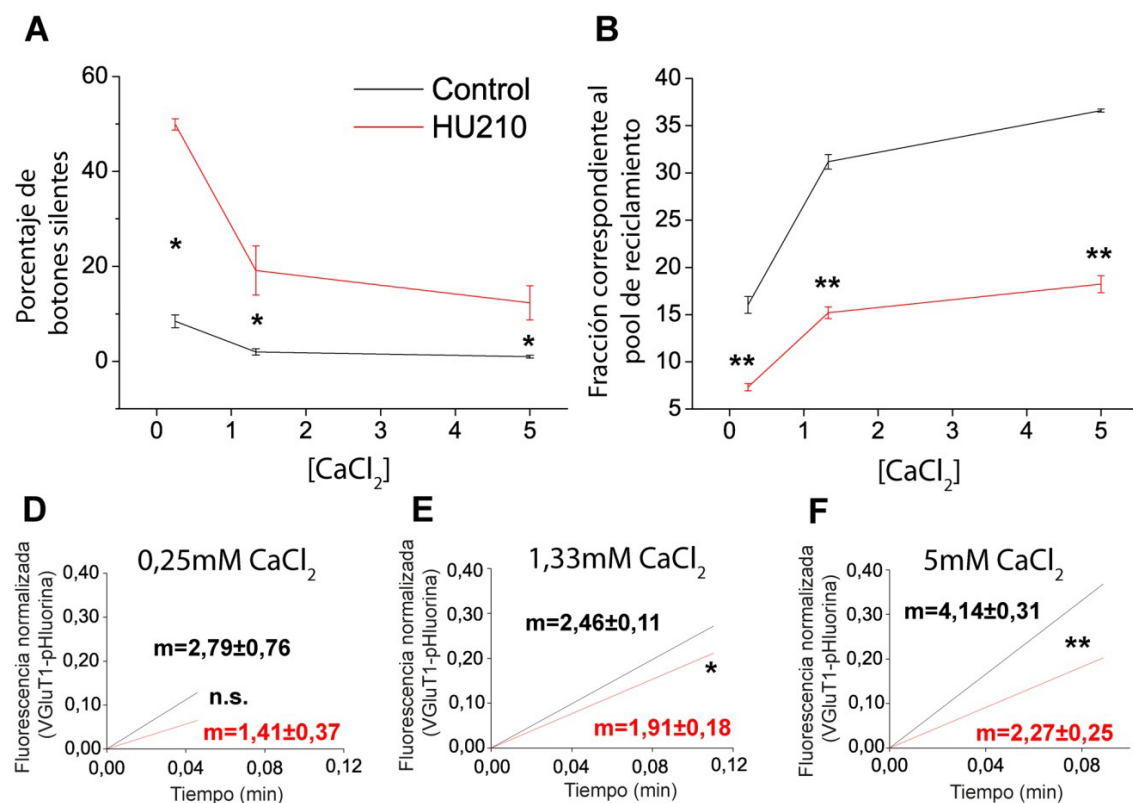


Figura 30- A) Porcentaje de botones silentes a las distintas concentraciones de calcio en control (negro) y tras la activación persistente del receptor CB1 (rojo). B) Fracción de vesículas media correspondiente al pool de reciclamiento a distintas concentraciones de calcio. D, E y F son los ajustes lineales de las pendientes de exocitosis a las concentraciones de calcio indicadas; n.s., no significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Prueba t de Student en A, D E y F; ANOVA con Bonferroni en B; D) r^2 control: 0,80; r^2 HU-210: 0,81; E) r^2 control: 0,99 ; r^2 HU-210: 0,95; F)) r^2 control: 0,97 ; r^2 HU-210: 0,94.

16- La inducción de silenciamiento es atribuible a una disminución en los niveles de cAMP

Una vez confirmada la calcio independencia del silenciamiento sináptico inducido por el tratamiento prolongado con un agonista del receptor CB1, se estudió la dependencia de este fenómeno de la inhibición de la adenilato ciclasa mediada por la activación de dicho receptor. En nuestro sistema, el tratamiento prolongado con el agonista HU-210 (10min, 5 μ M) dio lugar a una reducción drástica de los niveles de cAMP (expresados en picomoles de cAMP por cada 100.000 células y normalizados al basal) similar a la observada tras tratar las células con el inhibidor de la adenilato ciclasa SQ-22536 (25', 100 μ M), sin embargo la incubación con ambos compuestos de forma simultánea produjo un efecto parcialmente aditivo, indicando que la inhibición producida por la activación del receptor CB1 sobre la adenilato ciclasa no es total, lo que puede ser debido a una deslocalización parcial de una subpoblación de receptores CB1 y determinadas adenilato ciclasas. Utilizamos el tratamiento con Forskolina a modo de activador positivo de nuestro sistema, encontrando una elevación de los niveles de cAMP de aproximadamente 70 veces la concentración observada en el basal (Figura 31A; **Basal:** $1,28 \pm 0,02$ pmoles/ 10^4 cels; $100 \pm 0\%$; **SQ-22536:** $0,75 \pm 0,06$ pmoles/ 10^4 cels; $58,37 \pm 4,13\%$, $**p < 0,01$; **HU-210:** $0,84 \pm 0,02$ pmoles/ 10^4 cels; $65,18 \pm 4,33\%$, $**p < 0,01$; **HU-210+SQ22536:** $0,50 \pm 0,08$ pmoles/ 10^4 cels; $38,85 \pm 6,21\%$, $**p < 0,01$; **Forskolina:** $89,97 \pm 12,64$ pmoles/ 10^4 cels; $7007,36 \pm 1083,76\%$, $**p < 0,01$). Las concentraciones de cAMP sin normalizar en cada uno de los distintos tratamientos se recogen en la figura 31A y los valores normalizados de cada uno de los días en la tabla 31C.

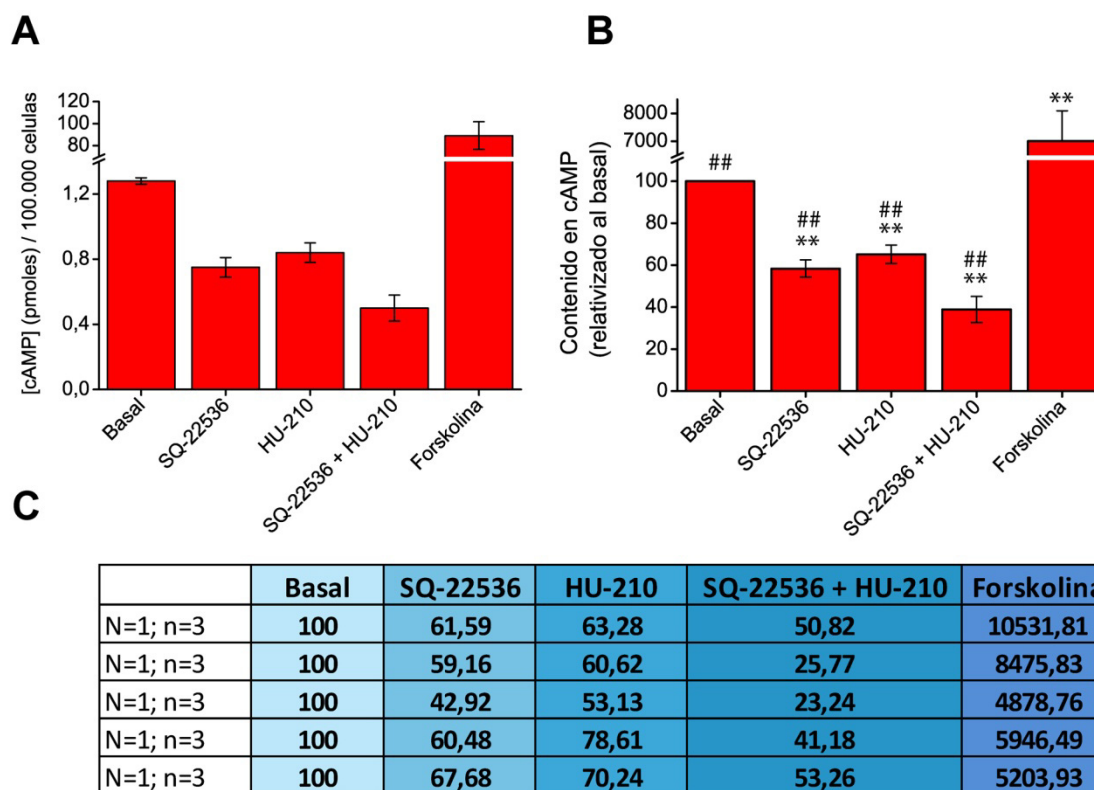


Figura 31- Niveles de cAMP en respuesta a los distintos tratamientos en pmoles/100.000 células (A) y normalizados al control (B); ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs Forskolina. Los datos normalizados de cada uno de los días de experimento se recogen en C (cada fila corresponde a un día distinto de experimento y a un cultivo diferente).

17-La activación de la vía del cAMP previene, de forma PKA-independiente y EPAC-dependiente, la inducción de silenciamiento sináptico mediada por CB1R.

Los ensayos de acumulación de cAMP realizados en presencia del agonista HU-210 junto con los experimentos funcionales con el indicador ratiométrico de calcio FURA-2 AM parecían apuntar a una calcio independencia, al menos parcial, del fenómeno de silenciamiento, que a su vez era paralelo a un descenso en las concentraciones de cAMP. Por este motivo decidimos llevar a cabo experimentos funcionales en los que se trató de prevenir la inducción del silenciamiento sináptico mediado por la activación del

receptor CB1 incrementando farmacológicamente los niveles de cAMP e intentando disecar molecularmente la cascada de señalización implicada en este fenómeno. Para ello llevamos a cabo experimentos funcionales en los que la inducción del silenciamiento sináptico por el tratamiento prolongado con el agonista HU-210 (10 min, 5 μ M) era precedida por una incubación con el activador directo del sitio activo de la adenilato ciclasa (Tesmer *et al.*, 1997), la Forskolina (50 μ M, 10min). Encontramos que la forskolina, por sí sola era capaz de prevenir la totalidad de los efectos funcionales inducidos por una incubación prolongada con un agonista CB1, en lo referente a la magnitud de la respuesta exocitótica y al número de botones silentes. Tratando de establecer en qué medida la prevención del efecto del HU-210 era dependiente de la activación por parte del cAMP de su diana canónica, la PKA, decidimos pre-tratar las células con H-89, un inhibidor selectivo de la PKA que compite con el quelato magnesio-ATP por la unión al centro activo de la enzima (Lochner y Moolman, 2006), de forma previa a la incubación con Forskolina. Descubrimos que, si bien la recuperación de la respuesta exocitótica no era total tras la inhibición de la PKA, sí se pudo observar una dramática reducción del número de botones silentes, lo que pone de manifiesto la existencia de mecanismos PKA dependientes e independientes que subyacen a la inhibición mediada por cannabinoides (Figura 32 C; Control, respuesta: $35,61 \pm 1,07\%$; N=3, n=169; HU-210, respuesta: $13,45 \pm 1,23\%$; **p<0,01 vs control, N=5, n=159; HU-210+Fsk, respuesta: $32,94 \pm 1,08\%$; no significativo vs. control, ##p<0,01 vs. HU-210; N=4, n=269; HU-210+Fsk+H-89, respuesta: $24,29 \pm 0,75\%$; **p<0,01 vs. control, ##p<0,01 vs. HU-210, N=7, n=417; ANOVA con Bonferroni; los datos referidos al número de respuestas silentes en todas las condiciones farmacológicas se compilan en la figura 34).

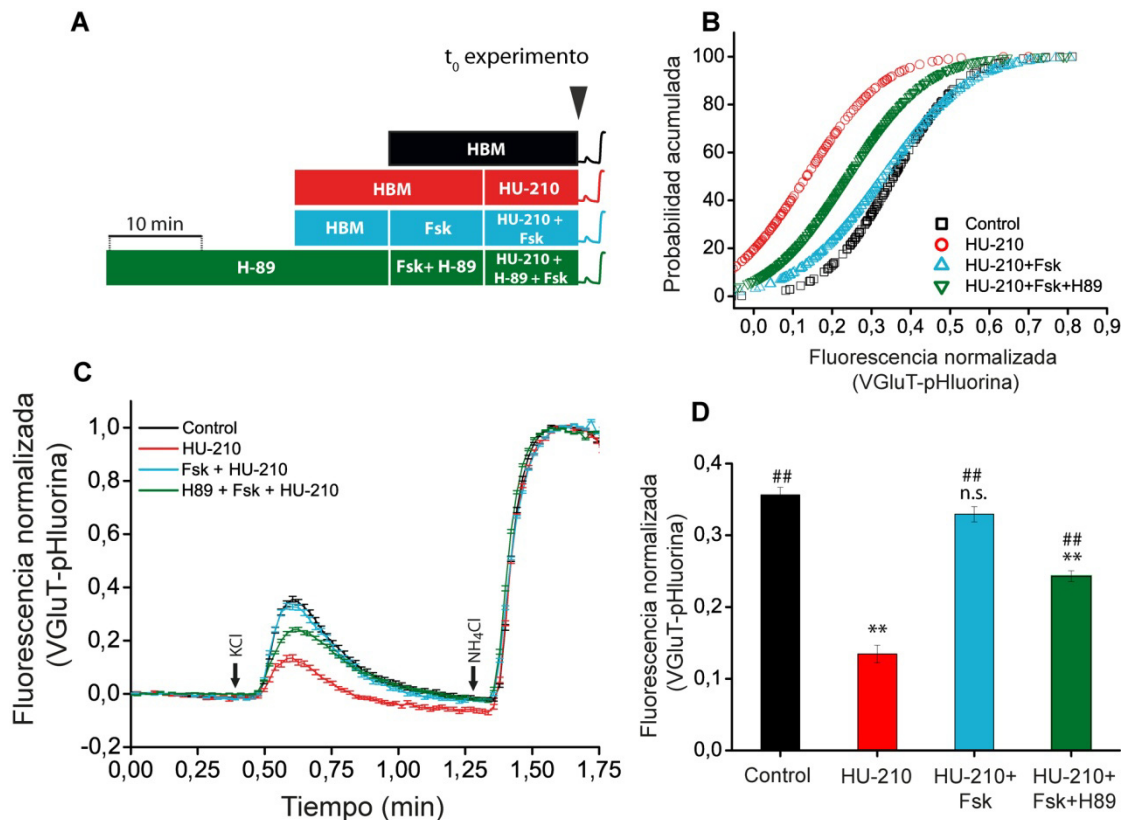


Figura 32- A) Protocolo de incubación empleado en cada condición, el código de colores es válido a lo largo de la figura. B) Distribución de probabilidad acumulada de las respuestas exocitóticas individuales. C) Medias cinéticas de la población total de botones, obsérvese que la inhibición de la enzima PKA permite una recuperación parcial de la respuesta. D) Gráfica de columnas de las respuestas promediadas en C, ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. HU-210, ANOVA con Bonferroni.

Con el objetivo de corroborar y estudiar en profundidad la independencia parcial de PKA que observamos en estos experimentos, llevamos a cabo una serie de experimentos funcionales en los que se trató de prevenir el efecto del HU-210 mediante la activación directa de la enzima a la que clásicamente se le han atribuido la mayoría de las acciones mediadas por el cAMP, la PKA. Mediante el uso del activador selectivo del dominio regulador de la PKA, el N⁶-Benzoil-cAMP (200 μ M, 5min) se intentó revertir el silenciamiento inducido por HU-210; el esquema del protocolo empleado para las

incubaciones se detalla en la figura 33 A. La activación directa de la PKA tras una incubación de 10 minutos con el agonista HU-210 no fue suficiente para revertir el fenómeno de silenciamiento y solo dio lugar a una recuperación parcial de las respuestas exocitóticas medias, si bien esta tendencia no mostró significación estadística con respecto al HU-210 (Figura 33 C; Control, respuesta: $45,93 \pm 1,48 \%$, $N=2$, $n=138$; HU-210, respuesta: $15,90 \pm 1,52\%$, $N=2$, $n=96$, $**p<0,01$ vs. control; HU-210 + N^6 -Bnz-cAMP, respuesta: $18,98 \pm 0,95\%$, $N=6$, $n=251$, $**p<0,01$ vs. control; no significativo vs. HU-210, ANOVA con Bonferroni)

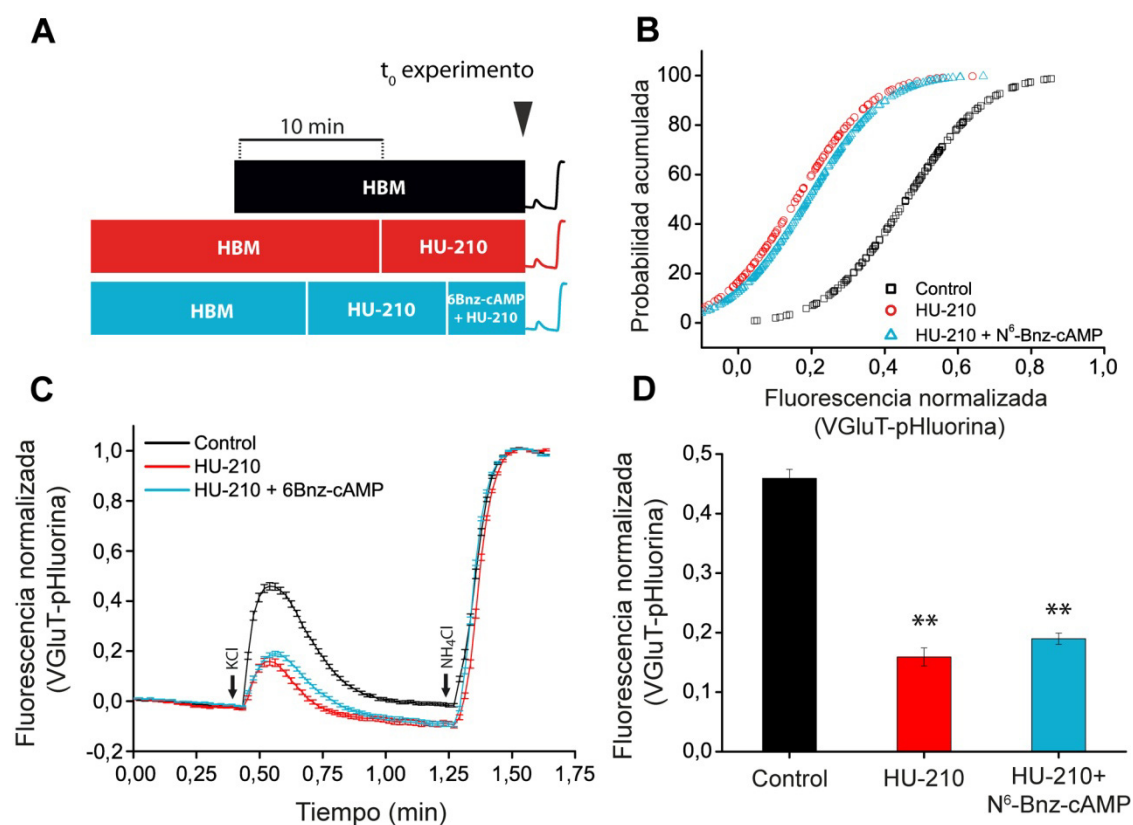


Figura 33- A) Protocolo de incubación empleado en cada condición, el código de colores es válido a lo largo de la figura. B) Distribución de probabilidad acumulada de las respuestas exocitóticas individuales. C) Medias cinéticas de la población total de botones, la activación de la enzima PKA no contrarrestó el efecto del HU-210. D) Gráfica de columnas de las respuestas promediadas en C, $**p<0,01$ vs. control; ANOVA con Bonferroni.

Una vez corroborada la independencia parcial de la PKA en el fenómeno de silenciamiento, tratamos de identificar a la diana molecular activada por cAMP responsable de la prevención del silenciamiento sináptico mediado por el HU-210. La proteína EPAC (del inglés *Exchange Protein directly Activated by C AMP*) es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina activable por cAMP descubierto en 1998 (de Rooij *et al.*, 1998). Su caracterización en células no neuronales demostró su implicación en la regulación de la exocitosis mediada por cAMP (Renstrom *et al.*, 1997; Ozaki *et al.*, 2000), mientras que en células neuronales la demostración de su implicación en este tipo de procesos es más reciente (Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004; Gekel y Neher, 2008). Para averiguar si parte de los efectos mediados por la activación del receptor CB1 podían ser prevenidos por la activación directa de la proteína EPAC, se diseñaron una serie de experimentos en los que las células se preincubaron con el activador selectivo de la proteína EPAC, el 8-Cpt-2'-O-Me-cAMP (50 μ M, 15 min.). El tratamiento con el activador de EPAC de forma previa a la inducción de silenciamiento con HU-210, redujo drásticamente el número de respuestas silentes y compensó la reducción exocitótica global mediada por la activación de CB1 (Figura 34 C; Control, respuesta: $36,87 \pm 1,29\%$, N=4, n=183; HU-210, respuesta: $27,11 \pm 1,76\%$, N=5, n=136; **p<0,01; HU-210 + 8-Cpt-cAMP, respuesta: $40,96 \pm 1,36\%$, N=5, n=144, no significativo). El porcentaje de botones silentes en las distintas condiciones se enumera a continuación y se ilustra en la figura 34 (Porcentaje de botones silentes; Control: $0,76 \pm 0,35\%$, N=13; Forskolina: $0 \pm 0\%$, N=2; H-89: $4,05 \pm 2,69\%$, N=5; Forskolina+H-89: $1,61 \pm 1,00\%$, N=3; HU-210: $30,33 \pm 4,77\%$, N=12; HU-210+Forskolinina: $1,54 \pm 0,73\%$, N=4; HU-210+Forskolinina+H-89: $6,44 \pm 1,30\%$, N=7; HU-210+8-Cpt: $4,33 \pm 1,29\%$, N=5; HU-210+N⁶-Bnz-cAMP: $23,40 \pm 4,36\%$, N=6)

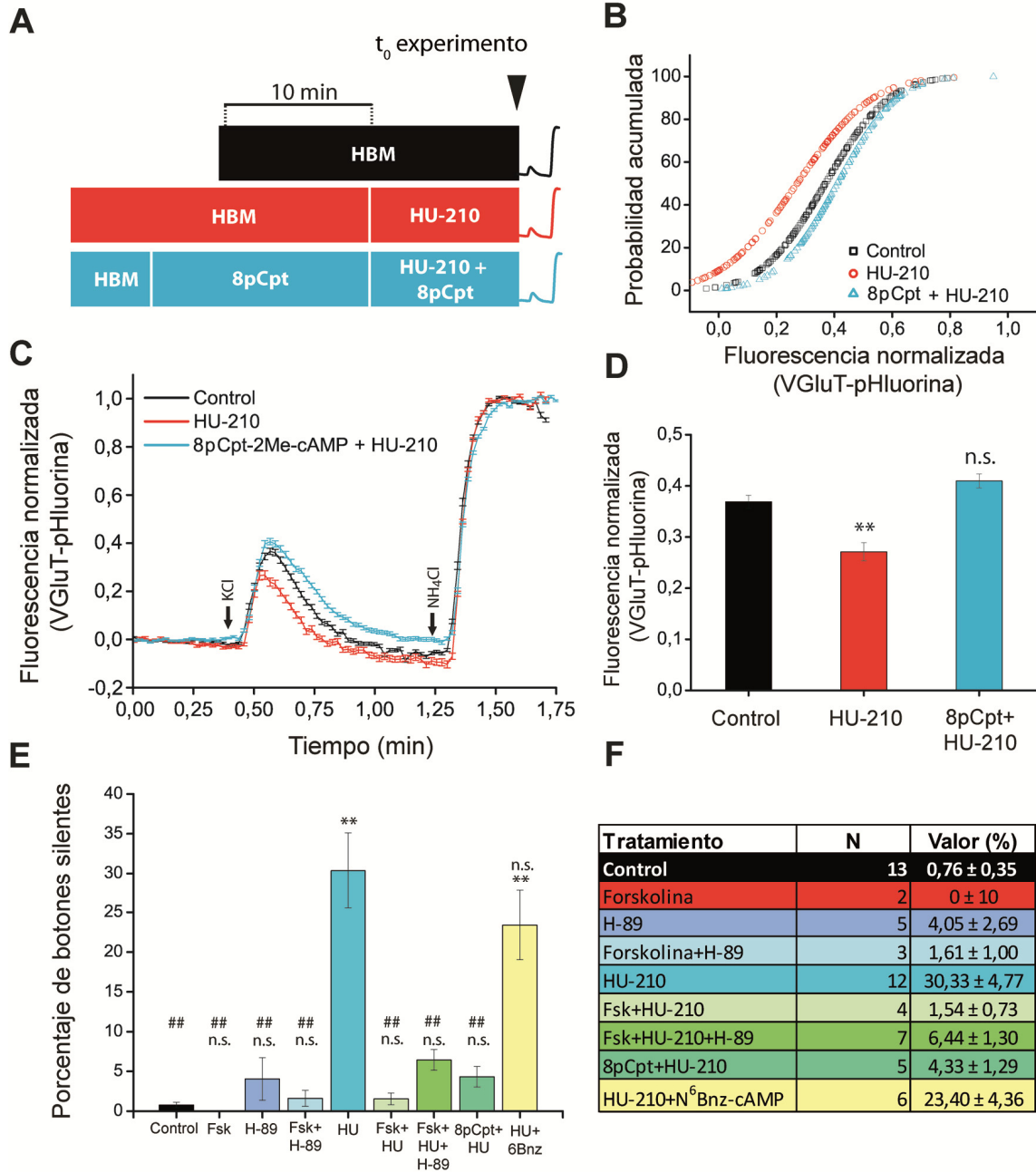


Figura 34- A) Protocolo de incubación empleado en cada condición experimental. B) Distribución de probabilidad acumulada de las respuestas exocitóticas individuales. C) Medias cinéticas de la población total de botones, obsérvese que la activación de EPAC contrarrestó el efecto del HU-210. D) Gráfica de columnas de las respuestas promediadas en C. E) Porcentaje de botones silentes en las condiciones indicadas, corresponden a las figuras 32 y 33, F) Se indican los valores correspondientes a cada tratamiento así como su N; ** $p < 0,01$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. HU-210; n.s. no significativo; ANOVA con Bonferroni en todas las comparaciones. *Fsk*: Forskolina; *HU*: HU-210; *6Bnz*: N⁶Bnz-cAMP.

18- La activación de la proteína EPAC es capaz de revertir el fenómeno de silenciamiento sináptico

Tratando de profundizar en la reversibilidad y en el curso temporal del proceso de silenciamiento, se llevaron a cabo experimentos en los que las incubaciones con el activador de la proteína EPAC se llevaban a cabo de forma ulterior a la inducción de silenciamiento por la activación de CB1R durante 10 minutos y tras un primer pulso de estimulación que permitía definir la población de botones silentes. En primer lugar caracterizamos temporalmente la reversibilidad del fenómeno, con objeto de definir una ventana temporal en la que llevar a cabo una aproximación farmacológica que adoleciese de una mínima influencia de la reversión espontanea del silenciamiento.

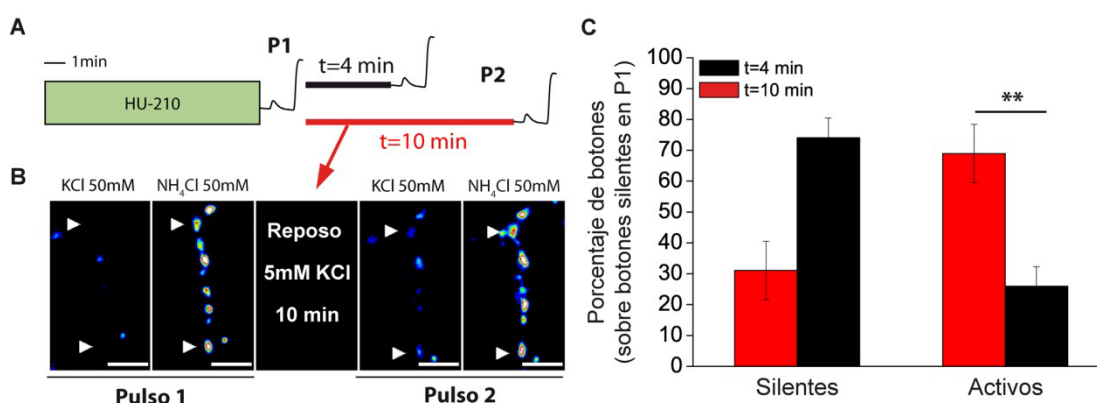


Figura 35- A) Esquema de los protocolos experimentales empleados para evaluar la persistencia del silenciamiento sináptico, el código de colores se mantiene a lo largo de la figura (negro: 4 minutos periodo inter-estímulo; rojo: 10 minutos periodo inter-estímulo). B) Ejemplo de re-activación espontánea de botones previamente silenciados con HU-210 tras 10 minutos en reposo después de una primera estimulación (puntas de flecha), barra de escala=5 μ m. C) Porcentaje de botones activos y silentes durante el segundo pulso (P2 en A y B), relativizados a los botones silentes del primer pulso (P1 en A y B), $*p < 0,05$, Prueba t de Student.

Encontramos que un amplio porcentaje de respuestas silentes se recuperaba de forma espontanea tras un periodo de 10 minutos en reposo precedido por un primer pulso de estimulación, mientras que no fuimos capaces de observar esta recuperación espontanea tras un periodo de 4 minutos (Figura 35B, Reversión espontanea tras 10 minutos: $68,95 \pm 9,45$ % de botones silentes, $N=3$; Reversión espontanea tras 4 minutos: $25,93 \pm 6,40$ % de botones silentes, $N=7$, $*p<0,05$, Prueba t de Student). Motivados por estas observaciones decidimos llevar a cabo las aproximaciones farmacológicas en un periodo de tiempo no superior a los 4 minutos de reposo entre estimulaciones sucesivas. En estos cuatro minutos las células se perfundieron bien con medio de lavado (condición control), bien con el activador selectivo de la proteína EPAC (8-p-Cpt-2-Me-O-cAMP, $50\mu\text{M}$, 4 minutos). Encontramos que el agonista de la proteína EPAC no solo era capaz de prevenir el fenómeno de inducción de silenciamiento, como se muestra en la figura 34, sino que también era capaz de revertirlo una vez puesto este en marcha por la activación prolongada del receptor CB1 (el protocolo experimental se detalla en la figura 35A). Para disecar finamente el fenómeno de silenciamiento del fenómeno clásico de inhibición presináptica, llevamos a cabo una segregación en las distintas subpoblaciones de respuestas sinápticas (respuestas activas y respuestas silentes) para observar específicamente los efectos del tratamiento sobre cada una de estas. Encontramos que el tratamiento con el activador de EPAC dio lugar a una recuperación de las cinéticas globales debido principalmente a la reactivación de respuestas silentes y no por la potenciación de las previamente activas (Figuras 36, B, C y D) ya que este fenómeno se observó también en condiciones control y es atribuible a la transitoriedad del proceso inhibitorio (Figura 37 A y 37 B).

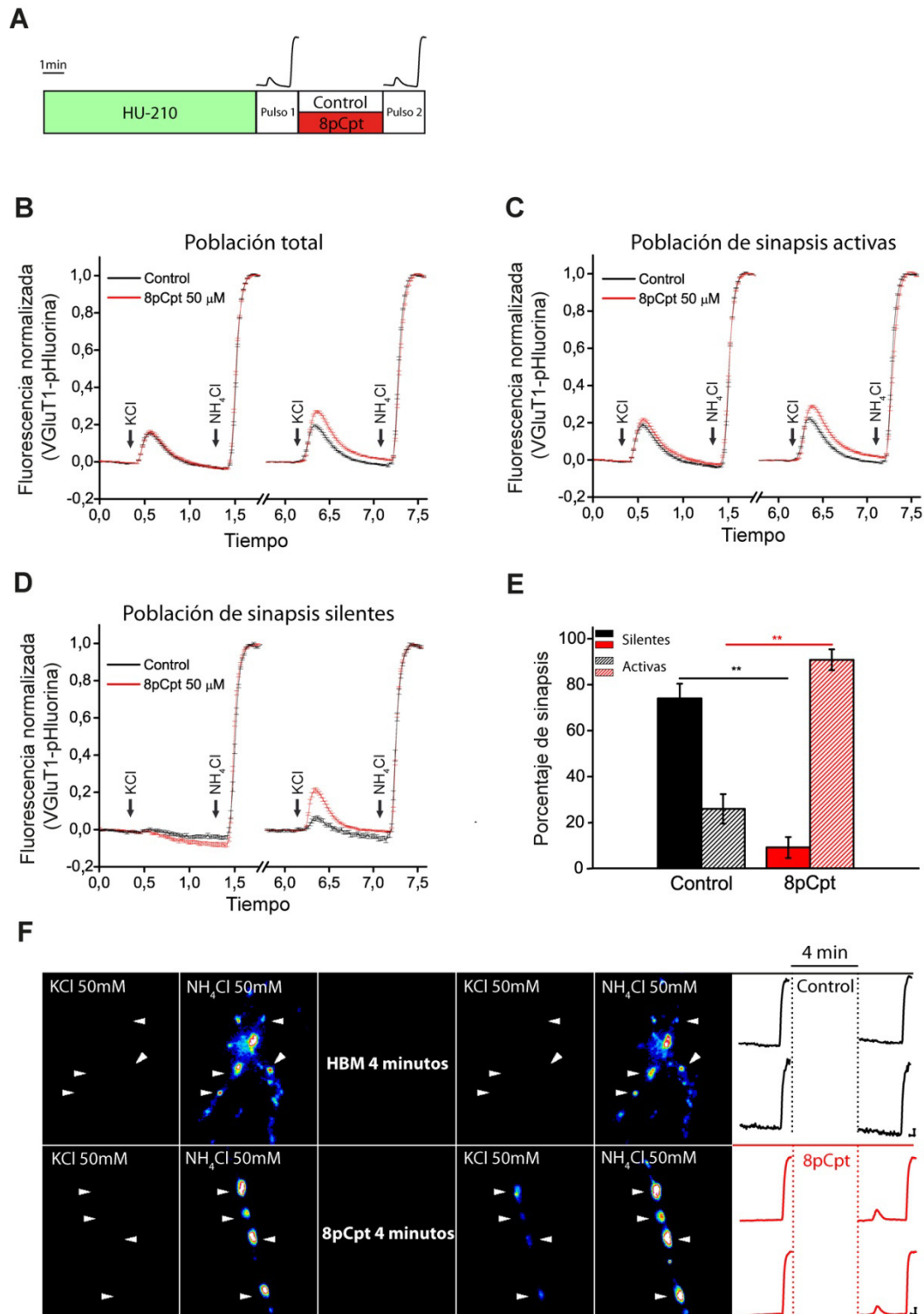


Figura 36- A) Esquema del protocolo experimental; B C y D) Cinéticas en neuronas control (negro) y en tratadas con 8-pCpt (rojo) tras la activación prolongada de CB1R en la población total, la subpoblación de sinapsis activas y la de sinapsis silentes, respectivamente. E) Porcentaje de sinapsis silentes, normalizado al total de sinapsis silentes durante el primer pulso. F) Ejemplo de activación de botones previamente silenciados con HU-210 tras 4 minutos de tratamiento con 8-pCpt, escala 20s, 10% Fluorescencia.

** $p < 0,01$ Prueba t de Student.

De forma acorde a estas observaciones encontramos que el porcentaje de botones silentes que permanecía inactivo en el segundo pulso se redujo drásticamente al tratar con 8-p-Cpt (Figura 36 E; Porcentaje de botones silentes relativizado a los silentes en el primer pulso; Control: $74,06 \pm 6,40$, N=7; 8-p-Cpt, N=9). Los picos de fluorescencia de cada una de las subpoblaciones en los distintos tratamientos se recogen en la figura 38 (Figura 38A; **Control** [N=7, n Total=358; n Activos=292; n Silentes=66]; Total P1: $15,77 \pm 0,66\%$; Activos P1: $19,16 \pm 0,65\%$, $**p<0,01$; Total P2: $19,45 \pm 0,66\%$; $**p<0,01$; Activos P2: $22,45 \pm 0,66\%$; $**p<0,01$ vs. Total P1; $##p<0,01$ vs Total P2; **8-Cpt** [N=9, n total=552; n Activos=413; n Silentes=139]; Total P1: $16,27 \pm 0,70\%$; Activos P1: $21,92 \pm 0,73\%$, $**p<0,01$; Total P2: $26,85 \pm 0,56\%$, $**p<0,01$; Activos P2: $28,50 \pm 0,63$, $**p<0,01$ vs. Total P1; no significativo vs. Total P2). En cuanto a las respuestas exocitóticas de la población silente se recogen sus medias en la figura 37 B.

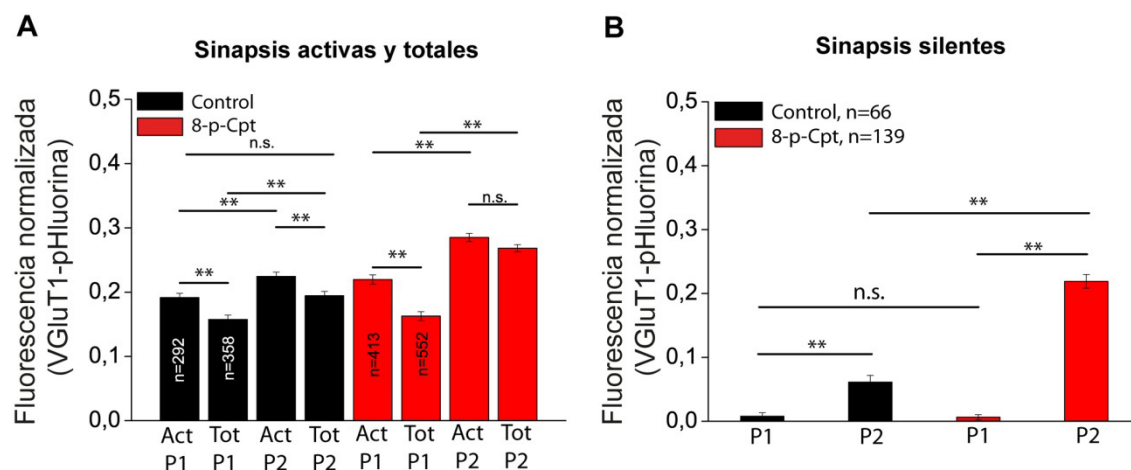


Figura 37- A) Respuestas exocitóticas medias de la subpoblación de sinapsis activas y de la población total (A) y de la subpoblación de sinapsis silentes (B), referida a la figura 36. Leyenda: Act P1: Botones Activos en el Pulso 1; Tot P1: Población total en el Pulso 1; Act P2: Botones Activos en el Pulso 2; Tot P2: Población total en el Pulso 2 (A); P1: Pulso 1; P2: Pulso 2 (B). $**p<0,01$; n.s. no significativo; ANOVA con Bonferroni en ambos casos.

La subpoblación de sinapsis silentes experimentó una re-activación estadísticamente significativa en condiciones control (Figura 37B; Control P1: $0,80 \pm 0,50$ %; Control P2: $6,15 \pm 1,0$ %, $**p < 0,01$); en cualquier caso esta reactivación fue significativamente mayor al tratar con 8-p-Cpt-2-Me-O-cAMP, lo que queda reflejado en la comparación de las respuestas exocitóticas de las sinapsis silentes de ambas condiciones durante el segundo pulso de experimento (Figura 37B; 8-p-Cpt P1: $0,65 \pm 0,41$ %, no significativo vs. Control P1; 8-p-Cpt P2: $21,91 \pm 1,07$ %; $**p < 0,01$ vs. 8-p-Cpt P1; $##p < 0,01$ vs. Control P2). Estos resultados indican que la vía Adenilato Ciclasa/cAMP/EPAC está implicada en el silenciamiento sináptico mediado por el receptor CB1

19- Marcadores presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento mediado por CB1R

Una vez caracterizado farmacológicamente el fenómeno de silenciamiento, decidimos llevar a cabo aproximaciones, mediante inmunocitoquímica *post-hoc*, que nos permitiesen dilucidar si existían características intrínsecas a las distintas sinapsis, a las que atribuir una susceptibilidad diferencial al silenciamiento. Aparte de las limitaciones metodológicas ya comentadas en el apartado 12 para el uso de la sonda FM1-43, existe una adicional en lo referente al estudio del silenciamiento sináptico; a diferencia de la VGluT1-pHluorina, que es un indicador codificado en una proteína, la FM1-43 es una sonda que experimenta un apagamiento constante en tiempos largos de experimento, lo que impide establecer un umbral numérico en torno al que clasificar las respuestas como silentes o activas. Esta limitación metodológica se ilustra en la figura 38A, en la que se muestra el paralelismo cinético entre una población de botones renuentes a responder durante la estimulación y botones estimulados en ausencia de calcio extracelular y en

presencia del quelante EGTA. Debido a que esta ausencia virtual de respuesta suele ir acompañada de una pérdida pequeña, aunque cuantificable, de los niveles de fluorescencia (aproximadamente un 15%), como se observa en la figura 38B, decidimos clasificar como botones silentes aquellos en los que, a pesar de poder apreciarse un apagamiento paulatino de la fluorescencia, no se observaron respuestas ante ninguno de los pulsos de estimulación.

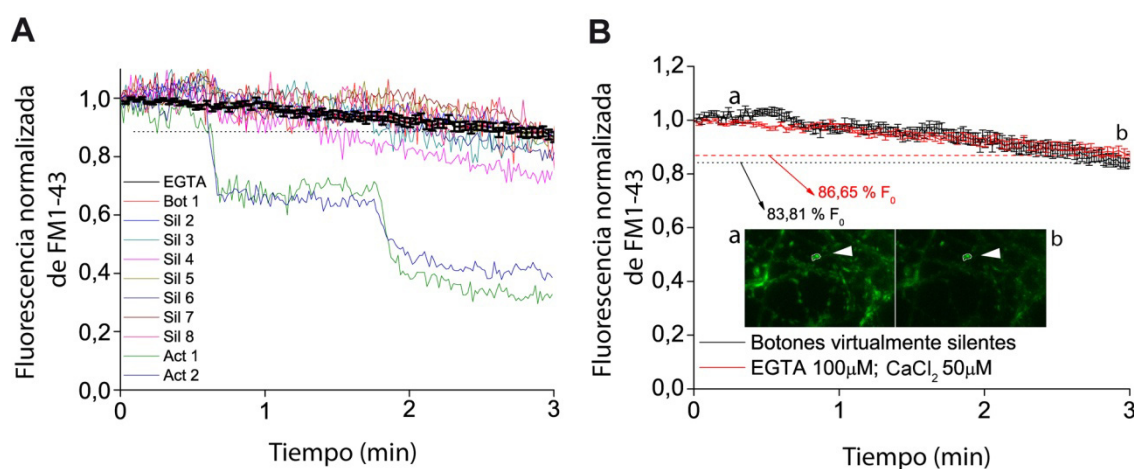


Figura 38- A) Se muestra un conjunto de botones silentes (Sil) en comparación con una media obtenida a partir de botones estimulados en presencia de EGTA y en ausencia de calcio extracelular (trazo negro grueso), se muestran dos botones activos (Act) para su comparación con la subpoblación de silentes. B) Cinética media de botones estimulados en presencia de EGTA y en ausencia de calcio extracelular junto a la cinética de los botones silentes; obsérvese que el apagamiento progresivo de fluorescencia es evidente en ambos casos. a) y b) hacen referencia a distintos tiempos experimentales, a) es previo y b) posterior a la estimulación. La micrografía insertada muestra una sinapsis silente antes y después de la estimulación.

Una vez definidas qué respuestas podían ser clasificadas como silentes en los experimento de FM1-43, decidimos llevar a cabo un análisis en el que se trató de determinar si existía una correlación entre la expresión del efecto de silenciamiento y la cantidad de distintas proteínas relacionadas con procesos excitotóxicos en terminales

presinápticos individuales, así como con la mayor localización del receptor CB1 en los distintos compartimentos presinápticos. Para ello se realizaron experimentos funcionales seguidos por una inmunocitoquímica *post-hoc*, con objeto de relacionar las respuestas cinéticas tras un tratamiento con HU-210 y los niveles de inmunorreactividad de forma semi-cuantitativa. Se analizaron dos proteínas de la maquinaria exocitótica (RIM1 α y Munc13-1) y el receptor presináptico CB1. El análisis del receptor CB1 se llevo a cabo en todos los experimentos, quedando estos finalmente constituidos por las parejas RIM1 α /CB1R y Munc13-1/CB1R. La estrategia que se siguió para llevar a cabo una segregación a ciegas de las distintas respuestas, atendiendo a sus niveles de inmunorreactividad, fue separar las distintas respuestas en grupos atendiendo a dicho valor, relativizado a la media de cada campo. Arbitrariamente se segregaron tres grupos: aquellos botones cuyo valor de inmunorreactividad era inferior a 0,5 veces el valor medio de inmunorreactividad; aquellos cuyo valor de inmunorreactividad era superior a dos veces la media y la población total. Posteriormente se seleccionaron los botones pertenecientes a cada grupo (sin tener en cuenta sus cinéticas individuales) y se representó la media de respuesta de cada uno de estos grupos; mediante este tipo de segregación se evita cualquier tipo de sesgo, pues ni la selección de las regiones de interés ni la posterior segregación de las respuestas se lleva a cabo de modo manual. Se muestra un ejemplo de cómo se procedió a la segregación en la figura 39, representándose un resultado positivo de segregación de inmunorreactividad.

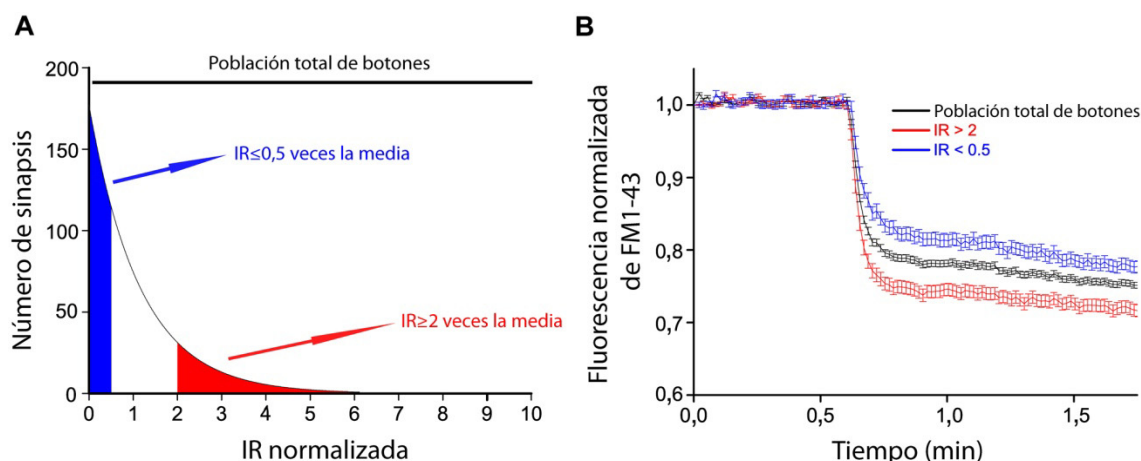


Figura 39- A) Representación gráfica de la segregación en grupos de inmunorreactividad sobre el histograma total de inmunorreactividades normalizadas al valor promedio. B) Gráficas de descarga de FM1-43 de cada uno de los grupos de inmunorreactividad mostrados en el apartado A.

Se encontró una relación entre el grado de descarga de FM1-43 inducido por una estimulación de 10 segundos de perfusión hipercalémica y los niveles de inmunorreactividad de la proteína RIM1 α , si bien sólo aquellos terminales con valores de inmunorreactividad superiores a dos veces la media exhibieron una respuesta diferente a la población total, no encontrándose diferencias significativas en la población con niveles de IR inferiores a 0,5 veces la media de la población (Figura 40B; Población total de botones: $18,71 \pm 0,34$ %, $N=4$, $n=541$; Sub-población $<0,5$ media de IR: $17,69 \pm 0,59$ %, $N=4$, $n=219$, no significativo, K-S Test; Sub-población >2 media de IR: $21,31 \pm 0,69$ %, $N=4$, $n=91$, $**p<0,01$ K-S Test). Al dividir los valores normalizados de inmunorreactividad de la proteína RIM1 α entre los valores normalizados de inmunorreactividad del receptor CB1, se obtuvo un cociente para cada uno de los terminales analizados al que denominamos cociente RIM1 α /CB1R. Se observó una segregación de ambos grupos, encontrándose que aquellos botones con

bajo contenido en la proteína RIM1 α y alto contenido en el receptor CB1 (RIM1 α /CB1R < 0,5) exhibían una menor descarga de FM1-43, además, las respuestas silentes se encontraron siempre confinadas a esta subpoblación de botones (Figura 40 D; Población total de botones: $18,71 \pm 0,34$ %, N=4, n=541; Subpoblación<0,5 RIM1 α /CB1R: $13,04 \pm 0,97$ %, N=4, n=55, **p<0,01, K-S Test; Subpoblación>2 RIM1 α /CB1R: $20,74 \pm 1,20$ %, N=4, n=48, **p<0,01 K-S Test). Inesperadamente, no se encontraron diferencias en el grado de de descarga al segregar las poblaciones atendiendo a los niveles de inmunorreactividad de la proteína Munc13-1 (Figura 41 B; Población total de botones: $21,85 \pm 0,19$ %, N=4, n=3842; Subpoblación<0,5 media de IR: $22,27 \pm 0,27$ %, N=4, n=1892, no significativo, K-S Test; Subpoblación>2 media de IR: $20,98 \pm 0,45$ %, N=4, n=583, no significativo, K-S Test). Tampoco se encontraron diferencias para los cocientes de inmunorreactividad entre la proteína Munc13-1 y el receptor CB1 (Ratio Munc13-1/CB1R) a diferencia de lo observado para el par de marcadores RIM1 α /CB1R (Figura 41 D; Población total de botones: $21,85 \pm 0,19$ %, N=4, n=3755; Sub-población<0,5 Munc13-1/CB1R: $20,53 \pm 0,40$ %, N=4, n=816, no significativo, K-S Test; Sub-población>2 Munc13-1/CB1R: $22,25 \pm 0,32$ %, N=4, n=1272, no significativo, K-S Test). Las diferencias observadas en el análisis de los distintos marcadores pueden deberse a la diferente sensibilidad de los anticuerpos o a los distintos mecanismos que rigen la función de estas dos proteínas, e indican el papel crucial de la proteína RIM en la susceptibilidad a los fenómenos inhibitorios operados por la activación del receptor CB1. Estos resultados demuestran que la expresión de distintos mecanismos de plasticidad puede venir determinada por características intrínsecas a cada sinapsis, pudiendo ser estos heterogéneos en función de la composición proteica de los distintos terminales.

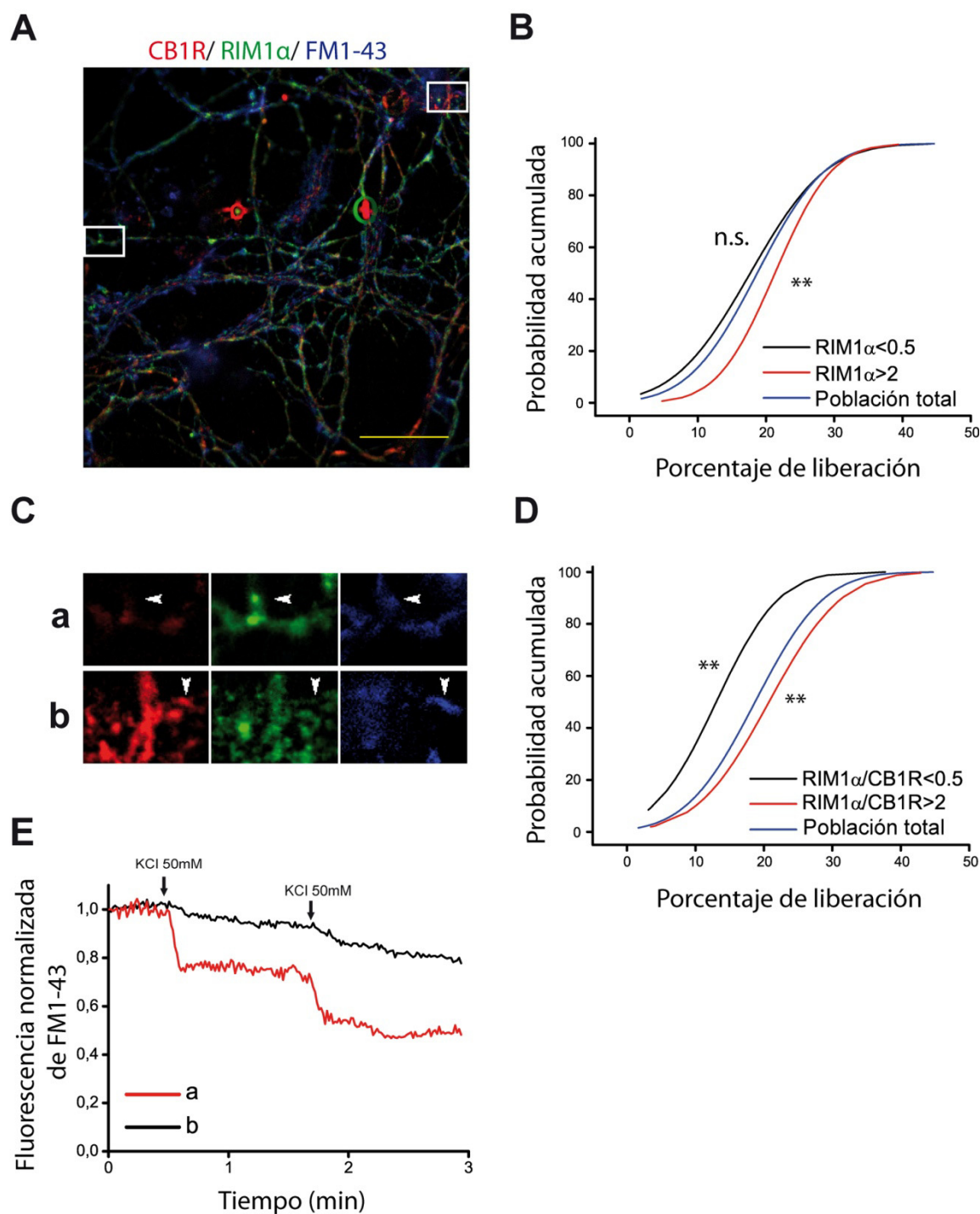


Figura 40- A) Imagen representativa de una inmunocitoquímica *post-hoc* contra RIM1 α (verde) y CB1R (rojo), FM1-43 se muestra en azul (pseudocolor). Barra de escala = 50 μ m. B) Gráfica de probabilidad acumulada de descarga de los distintos grupos de inmunorreactividad de RIM1 α . C) Se muestran dos botones, uno de ellos con un alto cociente RIM1 α /CB1R (a) y otro con bajo cociente RIM1 α /CB1R (b). D) Gráfica de probabilidad acumulada de descarga de los distintos grupos de cocientes RIM1 α /CB1R. E) Registros cinéticos de los terminales mostrados en C. ** p <0,01; n.s. no significativo; K-S Test.

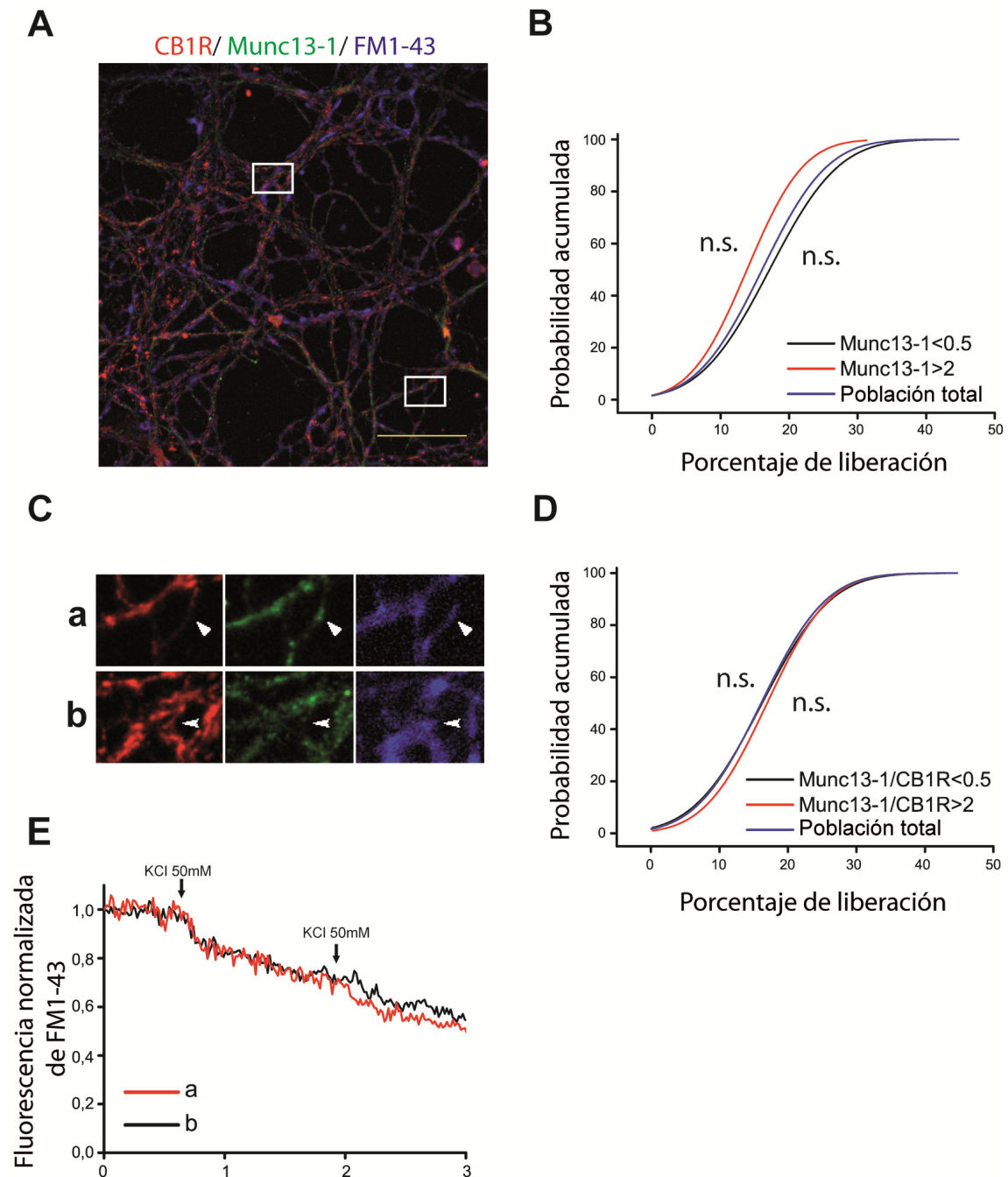


Figura 41- A) Imagen representativa de una inmunocitoquímica *post-hoc* contra Munc13-1 (verde) y CB1R (rojo), FM1-43 se muestra en azul (pseudocolor). Barra de escala = 50 μ m. B) Gráfica de probabilidad acumulada de descarga de los distintos grupos de inmunorreactividad de Munc13-1. C) Se muestran dos botones, uno de ellos con un alto cociente Munc13-1/CB1R (a) y otro con bajo cociente Munc13-1/CB1R (b). D) Gráfica de probabilidad acumulada de descarga de los distintos grupos de cocientes Munc13-1/CB1R. E) Registros cinéticos de los terminales mostrados en C. $**p<0,01$; n.s. no significativo; K-S Test.

V- Discusión

"Razonar y convencer, ¡qué difícil, largo y trabajoso!

¿Sugestionar? ¡qué fácil, rápido y barato!

S. Ramón y Cajal

IV-Discusión

1-Diferencias en la eficacia de reciclamiento y heterogeneidad de respuestas sinápticas

En nuestro modelo experimental (células granulares de cerebelo de rata a 7DIV), mediante experimentos con la sonda FM1-43, observamos un amplio repertorio de respuestas cinéticas tras la estimulación por perfusión de una solución que contenía KCl 50mM. A pesar de que las respuestas individuales se distribuyeron de forma continua, mediante un análisis de conglomerados y un ajuste a dos gaussianas, fue posible segregar dos subpoblaciones de respuestas, en torno a un umbral de aproximadamente un 40 % de descarga respecto a la fluorescencia inicial de cada una de las sinapsis individuales. A estas dos poblaciones se las denominó: población de descarga débil (población cuya respuesta total no superó el 40% de su fluorescencia inicial) y población de descarga fuerte (aquella cuya respuesta fue superior al 40% de su fluorescencia inicial). La variabilidad observada en términos de eficacia de reciclamiento de los terminales individuales ha de guardar relación con alguna de las fases del ciclo vesicular, ya sea el periodo de exocitosis monitorizado durante el experimento (lo que conduciría a una estimación directa de la fuente de variabilidad) o el periodo de exo/endocitosis inducido con objeto de incorporar la sonda en el lumen de las vesículas sinápticas (lo que conduciría a un análisis indirecto de la fuente de variabilidad). Una vez segregadas las dos poblaciones de respuestas se analizaron en ellas otros parámetros relacionados con la eficacia de reciclamiento tales como las fluorescencias iniciales de cada uno de los botones sinápticos (parámetro relacionado con el total de vesículas exocitadas y posteriormente endocitadas durante la fase de incorporación de la sonda) y las constantes temporales de exocitosis (relacionadas con

la velocidad de exocitosis durante el periodo de estimulación). Respecto a las constantes de exocitosis, las cinéticas observadas mostraron un patrón bifásico de descarga, lo que permitió su ajuste a un decaimiento exponencial de segundo orden, que arrojó dos constantes temporales: una rápida, relacionada con las primeras fases de exocitosis durante la estimulación (τ_1) y una lenta, relacionada con las fases tardías de exocitosis durante la estimulación (τ_2). El ajuste a un decaimiento exponencial de segundo orden es coherente con lo descrito previamente por otros grupos para distintos tipos neuronales (Klingauf *et al.*, 1998; Mozhayeva *et al.*, 2002) lo que nos permitió corroborar la validez de las respuestas sinápticas que se estaban analizando. Se encontró que la población de descarga débil adolecía de una menor velocidad en la liberación de su contenido vesicular, lo que guarda relación bien con una menor eficacia de exocitosis o bien con una menor eficacia de reciclamiento de las vesículas exocitadas durante la fase de incorporación de la sonda. Paralelamente se encontró que la fluorescencia inicial de los botones de descarga débil era superior a la de los botones de descarga fuerte; este dato es indicativo de que la superficie de membrana vesicular expuesta al medio extracelular conteniendo FM1-43 durante la fase de incorporación (parámetro directamente relacionado con el número de vesículas exocitadas durante dicha fase) fue mayor en esta subpoblación de botones. Este dato siembra una duda acerca de la estrategia de segregación de las respuestas sinápticas en dos subpoblaciones, pues si el porcentaje de descarga es normalizado a la fluorescencia inicial de los botones y esta fluorescencia es mayor en una de las subpoblaciones, aun a pesar de que la fracción exocitada, en términos absolutos (u.a.f. de FM1-43), por las dos subpoblaciones, fuese de la misma magnitud, los botones con mayor fluorescencia inicial descargarían una menor fracción de fluorescencia normalizada. Esta duda quedó disipada al realizar experimentos en cultivos pre-tratados durante 24 horas con el fitoestrógeno daidzeina,

compuesto que acelera la maduración funcional de los cultivos neuronales (Chindewa *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2012). En estas condiciones se observó un aumento del porcentaje de botones que exhibían un patrón de descarga fuerte, de forma paralela a un aumento de las fluorescencias iniciales. Este dato indica que la menor eficacia de reciclamiento, asociada en condiciones control a unas mayores fluorescencias iniciales, no es un artefacto matemático derivado de la normalización. Otro factor que podría estar afectando a las fluorescencias iniciales, y por tanto al dato obtenido tras la normalización a estas, es la exocitosis espontánea que pudiese tener lugar durante el tiempo de lavado de la sonda. Con objeto de distinguir si el tiempo de lavado estaba teniendo algún efecto en las fluorescencias iniciales, se llevaron a cabo experimentos en los que se modificó tanto el tiempo de lavado de la sonda como la presencia de calcio en el medio de lavado. El aumento de los tiempos de lavado disminuyó las fluorescencias iniciales de forma global, pero no las diferencias relativas entre ambos grupos de sinapsis, lo que descarta la posibilidad de que la menor fluorescencia inicial observada en los botones de descarga fuerte esté relacionada con un fenómeno de exocitosis espontánea. Por otro lado, en lo referente a la presencia o ausencia de calcio en el medio de lavado se observó que el calcio promovió, a todos los tiempos ensayados, una mayor fluorescencia inicial, fenómeno atribuible a que la compleción de la endocitosis sináptica es calcio dependiente (Dittman y Ryan, 2009; Wu *et al.*, 2009; Cheung y Cousin, 2013), si bien es cierto que las diferencias relativas entre el grupo de descarga fuerte y el de descarga débil se mantuvieron independientemente de la presencia o ausencia de calcio en el medio. De forma paralela se encontró que ni los tiempos de lavado ni la presencia de calcio en el medio de lavado alteraban los porcentajes de descarga de las dos subpoblaciones de botones sinápticos.

2- La magnitud de la exocitosis determina la eficacia de reciclamiento

Motivados por estas observaciones decidimos diseñar una serie de experimentos para caracterizar el defecto en el ciclo vesicular subyacente a la pérdida en eficacia de reciclamiento en una subpoblación de terminales. Para dilucidar en qué medida la pérdida en eficacia de reciclamiento guardaba relación con la magnitud del fenómeno exocitótico que induce la incorporación de la sonda, se llevo a cabo un protocolo en el que se modificaron las concentraciones de calcio presentes en el medio extracelular durante dicha fase. De este modo, se trató de disminuir la magnitud de la estimulación neuronal durante la fase de carga, lo que presumiblemente conllevaría la fusión de un menor número de vesículas con la membrana plasmática o, al menos, una menor frecuencia de fusión vesicular. Se observó que la disminución de la concentración de calcio en el medio extracelular conllevó un aumento en las eficacias globales de reciclamiento. Este fenómeno no implicó una reducción en el número de botones marcados en la unidad de longitud, por tanto estos resultados se interpretan como una relación inversa entre el número de vesículas que se fusionan con la membrana y la eficacia de reciclamiento de las mismas, descartándose una reducción en el reclutamiento sináptico. La explicación más plausible a este hecho, sería pensar en que un exceso de membrana vesicular, fusionada con la membrana presináptica durante periodos de estimulación neuronal prolongada a concentraciones fisiológicas de calcio, estaría activando procesos no canónicos de endocitosis compensatoria, con menor eficacia de reciclamiento (Heuser y Reese, 1973; Clayton y Cousin, 2009; Hosoi *et al.*, 2009; Saheki y De Camilli, 2012). La baja intensidad de estimulación (0,25 mM CaCl_2 extracelular) no sería capaz de inducir una oleada masiva de exocitosis vesicular, previniendo al terminal presináptico de la puesta en marcha de los mencionados procesos (Clayton *et al.*, 2008; Kim y von Gersdorff, 2009). De hecho, a 0,25 mM

CaCl₂, solo pudimos detectar una representación marginal de los botones con baja eficacia de reciclamiento. Estos resultados serían acordes a lo descrito para formas de endocitosis masiva, en los que tras periodos sostenidos de exocitosis, se invaginan largas superficies de membrana que finalmente rinden, por gemación, intermediarios endocitóticos de tipo endosomal (Clayton *et al.*, 2009; Saheki y De Camilli, 2012; Chandrasekar *et al.*, 2013).

3- Concentraciones de FM1-43 y eficacia de reciclamiento

La modificación de las concentraciones de sonda durante el periodo de carga se llevó a cabo con el objetivo de poner de manifiesto un marcaje diferencial de los botones, teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de la sonda FM1-43 (Cousin, 2008) así como las potenciales diferencias en composición lipídica de diferentes tipos de membranas endocitóticas, tal y como había descrito el grupo de Michael Cousin (Clayton y Cousin, 2008). Los experimentos realizados a las concentraciones elegidas (10μM, 5μM y 3μM) evidenciaron una disminución en el número de botones marcados, como reflejan las densidades de botones sinápticas en cada uno de los casos. Además, esta disminución en el número de botones funcionales fue acompañada selectivamente de una disminución del porcentaje de botones denominado de grupo de descarga fuerte, lo que quedó patente en la proporción de botones del grupo de descarga fuerte respecto a los del grupo de descarga débil. Este hecho tuvo impacto en las cinéticas medias de descarga, así como en las cinéticas parciales de descarga de cada uno de los grupos. Por tanto, la disminución de las concentraciones de sonda durante el periodo de carga dio lugar a una disminución virtual de la densidad de botones sinápticos en detrimento de aquellos botones de descarga fuerte o alta eficacia de reciclamiento. Las explicaciones

al fenómeno observado pueden ser varias. En primer lugar, si las formas de endocitosis asociadas a reciclamiento de baja eficacia, son más lentas que las formas de endocitosis mediada por clatrina (Bartolome-Martin *et al.*, 2012), lo observado en este experimento podría representar que el cierre del poro que comunica dichas formas de endocitosis con el medio extracelular es más lento que el paso de fisión vesicular en la endocitosis mediada por clatrina, lo que permitiría un mayor tiempo de exposición a la solución que contiene la sonda y por tanto una mayor partición de la sonda en la membrana. Otra posibilidad es la diferencia de hidrofobicidad de las membranas correspondientes a los distintos tipos de endocitosis. Es posible que distintos orgánulos membranosos intracelulares exhiban características diferenciales en lo que a hidrofobicidad se refiere (van Meer *et al.*, 2008). Si el reciclamiento por medio de una u otra ruta de endocitosis implicase distintos tipos de orgánulos, sería plausible que variase la composición de las membranas recuperadas y su hidrofobicidad, reteniendo mejor la sonda FM1-43 y por tanto haciéndose patente esta inclusión diferencial de la misma en distintos tipos de membranas al disminuir las concentraciones. La selectividad de las distintas sondas por distintas fracciones de la membrana se ha puesto de manifiesto recientemente (Clayton y Cousin, 2008; Chung *et al.*, 2010), demostrándose que la sonda FM1-43 marca preferentemente la endocitosis masiva por ser más hidrofóbica, mientras que la FM2-10, que difiere con FM1-43 en dos carbonos de la cola hidrocarbonada (Cousin, 2008), parece marcar preferentemente la endocitosis de vesículas simples (Clayton y Cousin, 2008). Sin embargo, en este trabajo los autores encuentran resultados opuestos a los obtenidos en nuestro laboratorio. En primer lugar cabe destacar que su aproximación metodológica se basa en lo siguiente: al aumentar las concentraciones de la sonda FM2-10 (más hidrofílica) se consigue marcar las membranas que participan en la endocitosis masiva, que no se consiguen marcar a concentraciones estándar de FM2-10. Por otro

lado, la FM1-43 es un buen trazador tanto de la endocitosis masiva, como de la endocitosis mediada por clatrina a sus concentraciones estándar, pero al disminuir su concentración marca sólo la endocitosis de tipo vesicular simple. Atendiendo a las hidrofobicidades relativas tanto de las distintas fracciones membranosas como de las distintas sondas, es lógico que el aumento de concentraciones de FM2-10 (de carácter relativamente hidrofílico) marque la población de vesículas más hidrofóbica que no consigue marcar a concentraciones estándar. Pero lo opuesto en cuanto a la disminución de las concentraciones de FM1-43 no es totalmente intuitivo, pues al disminuir su concentración deberíamos aumentar su selectividad hidrofóbica, no empezar a marcar selectivamente la fracción membranosa algo más hidrofílica. Por otro lado, el protocolo de estimulación descrito en dicho trabajo para cargar/descargar la sonda es sustancialmente distinto al nuestro, pues ellos llevan a cabo un total de 4 rondas de estimulación (carga-descarga//carga2-descarga2) de las que comparan entre sí las dos descargas. Las dos primeras rondas de estimulación podrían haber inmovilizado una fracción del pool vesicular que no se tiene en cuenta en la segunda descarga, lo que haría observar una descarga más eficiente en el segundo periodo de descarga, correspondiente a la subpoblación de vesículas más fácilmente reutilizable, lo que posiblemente generaría una mayor tasa normalizada de descarga en el segundo estímulo, como realmente ocurre en dicho artículo (Clayton y Cousin, 2008). Nuestro siguiente objetivo fue, por tanto, comprobar si, efectivamente, las formas de endocitosis puestas en marcha tras la estimulación masiva de estas neuronas permanecían más tiempo en contacto con el medio extracelular o si, por el contrario, las diferencias de marcaje eran exclusivamente atribuibles a la hidrofobicidad relativa de cada tipo de membrana.

4- Las formas de endocitosis poco eficaces persisten tras la estimulación.

Coexistencia de rutas de reciclamiento

Con la intención de caracterizar el curso temporal de las distintas formas de endocitosis y su contribución a cada uno de los patrones de descarga, se diseñaron una serie de experimentos en los que se trató de introducir el marcador FM1-43 en el lumen de las vesículas sinápticas exponiendo las neuronas granulares a la sonda de forma posterior a su estimulación. De este modo, se pueden trazar selectivamente aquellas formas de endocitosis lentas (y persistentes tras la estimulación), con objeto de disecar, tras una estimulación posterior, su contribución a los distintos patrones cinéticos. Al incorporar la sonda en estas condiciones se observaron varios efectos: una disminución de las cinéticas globales de descarga, una inversión de los porcentajes de respuestas cinéticas a favor de aquellas de descarga débil y una disminución del número de botones en la unidad de longitud. Estos resultados son compatibles con una contribución mayoritaria de un tipo de endocitosis lenta y persistente a los fenómenos de reciclamiento ineficaz, lo que es coherente con el marcaje selectivo de estas formas de endocitosis a bajas concentraciones de sonda. La presencia de una mayor superficie de membrana de aquellos orgánulos que participan en este tipo de endocitosis también podría dar cuenta de las diferencias observadas. Nuestra interpretación de estos resultados es que las formas de endocitosis asociadas al reciclamiento ineficaz son más lentas que las asociadas al reciclamiento eficaz y posiblemente impliquen la recuperación de mayores superficies de membrana (Richards *et al.*, 2000). El razonamiento es el siguiente: en el caso de que la respuesta exocitótica observada en condiciones control durante el experimento de imagen venga determinada por la contribución relativa de dos mecanismos de endocitosis (uno eficaz y otro ineficaz) a la capacidad global de reciclamiento, suponemos que cuanto menor sea la respuesta de los botones, mayor será

la contribución de la vía considerada ineficaz. Independientemente de cuál fuese la endocitosis rápida, la eficaz o la ineficaz, su contribución a la fluorescencia inicial será mayor en las condiciones estándar de carga, ya que los intermediarios endocitóticos no estarían expuestos al medio de lavado durante los 10 minutos posteriores a la incorporación de la sonda. Lo opuesto es aplicable para la carga posterior a la estimulación. La contribución de las formas eficaces de endocitosis es mayor i) a bajas concentraciones de calcio; ii) a altas concentraciones de sonda y iii) al incorporar la sonda durante la estimulación; las formas ineficaces son más evidentes a i) altas concentraciones de calcio; ii) bajas concentraciones de sonda y iii) al incorporar la sonda de forma posterior a la estimulación. Mientras que el número de botones no se vio modificado al variar las concentraciones de calcio, lo que indica un cambio en los mecanismos de reciclamiento, sí se vio reducido al disminuir las concentraciones de sonda y al incorporarla de forma posterior a la estimulación, indicando que, sin modificar los mecanismos de reciclamiento (ya que la estimulación se llevó a cabo en las mismas condiciones), estas variaciones experimentales consiguen marcar selectivamente una sub-población de botones. Aunque estos tratamientos reducen significativamente el número de botones en la unidad de longitud, la magnitud de esta reducción nos lleva a pensar que ambos mecanismos coexisten temporalmente (en la mayoría de los casos) en un mismo terminal sináptico, durante la estimulación en condiciones control. Se concluye que la endocitosis asociada a formas ineficaces de reciclamiento es más lenta (la cara luminal de los orgánulos generados durante este proceso permanece más tiempo en contacto con el medio extracelular) y probablemente implique orgánulos que contengan una mayor superficie de membrana.

5- Papel de la dinamina en las distintas formas de reciclamiento

El estudio de la contribución de la dinamina a las distintas formas de reciclamiento, puso de manifiesto que en condiciones de intensa estimulación a concentraciones fisiológicas de calcio (1,33mM CaCl_2 extracelular), se activaban mecanismos de endocitosis independientes de la actividad GTPasa de la dinamina. Sin embargo, en presencia de bajas concentraciones de calcio extracelular (0,25mM CaCl_2 extracelular), todas las formas de endocitosis eran estrictamente dependientes de la actividad GTPasa de la dinamina (presumiblemente, endocitosis mediada por clatrina). Los orgánulos membranosos marcados con FM1-43 y endocitados en presencia de un inhibidor de la actividad GTPasa de la dinamina, mostraron una ausencia total de respuesta al llevar a cabo una estimulación posterior de estas células con cloruro potásico. Estos resultados indican que las rutas endocitóticas que contribuyen a la ineficacia en el reciclamiento son mayoritariamente dinamina independientes y únicamente se ponen en marcha en condiciones de estimulación intensa. La modificación de las condiciones de estimulación por disminución del calcio extracelular puso de manifiesto que estas vías no se activan a bajas intensidades de estímulo (condiciones en las que la mayoría de botones exhiben reciclamiento eficaz). Se han caracterizado inhibidores de la dinamina cuyo mecanismo de acción se basa en el impedimento de su reclutamiento a membrana, por competencia con determinados fosfolípidos de membrana en la unión a la mencionada enzima. Decidimos explorar si mediante este mecanismo de inhibición de la dinamina era posible reproducir los resultados obtenidos en presencia de dynasore. Sorprendentemente, observamos una ausencia total de marcaje con FM1-43 en todas las condiciones ensayadas. Los bajos valores de fluorescencia de las regiones identificadas como potenciales elementos presinápticos impidieron la normalización y, por tanto, el análisis de estas respuestas. Por tanto, la inhibición del reclutamiento a membrana de la

dinamina, conllevó un bloqueo total de todas las formas de endocitosis. Las diferencias en el mecanismo de acción de cada uno de estos compuestos podrían subyacer a las variaciones experimentales observadas. Mientras que la inhibición con Dynasore se basa en el bloqueo del mecanismo catalítico de la enzima, la inhibición con MiTMab impide el posicionamiento de la enzima en su localización efectiva, en términos funcionales. Existe cierta controversia en lo referente al papel de la dinamina en la endocitosis masiva. Algunos autores defienden que la dinamina es prescindible en la escisión de los orgánulos generados durante este tipo de endocitosis, basándose en las observaciones llevadas a cabo en animales carentes de la isoforma I de la dinamina (principal isoforma sináptica), en los que es posible inducir endocitosis masiva en respuesta a altas intensidades de estimulación (Ferguson *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008; Saheki y De Camilli, 2012). Una proteína de tipo F-BAR denominada sindapina, así como remodelaciones del citoesqueleto de actina, se han propuesto como los principales candidatos a mediar la fuerza contráctil requerida para la gemación de este tipo de orgánulos (Itoh y De Camilli, 2006; Andersson *et al.*, 2008; Clayton *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que la dinamina sufre un ciclo de desfosforilaciones/refosforilaciones durante estos fenómenos, como se comenta en la introducción (Anggono y Robinson, 2007; Clayton *et al.*; Clayton y Cousin, 2009; Clayton *et al.*). La interacción dinamina-sindapina es dependiente de la desfosforilación de la dinamina (Clayton *et al.*, 2007). Por tanto, el estado de fosforilación de la dinamina, así como el reclutamiento de la sindapina a membrana, parecen funcionar como el interruptor molecular que pone en marcha los procesos de endocitosis masiva (Clayton *et al.*, 2009; Clayton y Cousin, 2009; Ferguson *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010; Saheki y De Camilli, 2012). Nuestros resultados son acordes con el siguiente escenario molecular: el reclutamiento de la dinamina a membrana y su posterior

desfosforilación posibilitan el reclutamiento de la sindapina a membrana (Clayton *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2011; Ferguson y De Camilli), donde media sus efectos contráctiles. Esta hipótesis es coherente con los datos experimentales observados, y concilia los distintos efectos de los inhibidores de la dinamina. La inhibición de la actividad GTPasa (prescindible para la gemación de orgánulos endosomales) permite la puesta en marcha de este tipo de endocitosis masiva ya que el reclutamiento de la sindapina a membrana no está impedido en estas condiciones. Por el contrario la inhibición del reclutamiento a membrana de la dinamina acarrearía un defecto en el posicionamiento de la sindapina, que no podría mediar sus efectos contráctiles. La independencia de la actividad GTPasa de la dinamina en los procesos de endocitosis masiva ha sido constatada en numerosos estudios (Ferguson *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos, nuestra propuesta es que si bien la actividad catalítica de la enzima es prescindible para el desarrollo de este tipo de procesos, su papel como reclutadora de proteínas es imprescindible para la endocitosis masiva. Estos resultados son parcialmente contradictorios con trabajos en los que se describe la existencia de endocitosis masiva en ausencia de la isoforma I de la dinamina (Ferguson *et al.*, 2007), si bien es cierto que en este tipo de animales otras isoformas podrían llevar a cabo el papel de la dinamina I por sobre-expresión homeostática, probablemente, de la dinamina III. En el único artículo publicado en el que se describe un triple mutante de la dinamina (Park *et al.*, 2013) el trabajo fue llevado a cabo sobre células no neuronales (fibroblastos en este caso), siendo difícil extrapolar estos resultados a la endocitosis compensatoria de las vesículas sinápticas.

6- Papel de la calcineurina en ambas formas de endocitosis

El uso del inhibidor de la calcineurina, FK-506, produjo un cambio dramático en la respuesta cinética de los botones sin modificar el número de los mismos en la unidad de longitud. La calcineurina parece jugar un papel crucial en la endocitosis masiva (Clayton *et al.*, 2007) así como en la endocitosis mediada por clatrina (Anggono *et al.*, 2006), regulando, por tanto, todas las formas de endocitosis conocida (Cousin y Robinson, 2001; Wu *et al.*, 2009). Se ha comprobado que un gran número de proteínas que participan en procesos de endocitosis, entre ellas la sinaptojanina, la amfifisina y la dinamina, sufren ciclos de fosforilación/desfosforilación durante la entrada de calcio en el terminal presináptico, y la puesta en marcha del ciclo vesicular, motivo por el que se las denominó en su conjunto *defosfinas* (Cousin y Robinson, 2001). La cronología de estos eventos ha sido sólo parcialmente disecada molecularmente, y existen controversias en lo que se refiere a cuál es el estado de fosforilación en el que encontraremos estas proteínas durante distintos tipos de endocitosis. La desfosforilación de la dinamina mediada por calcineurina ha sido implicada tanto en la endocitosis mediada por clatrina (Cousin y Robinson, 2001) como en los fenómenos de endocitosis masiva (Clayton *et al.*, 2007; Clayton *et al.*, 2009). Paradójicamente, la fosforilación en las serinas 774 y 778 de la dinamina, que parece mediada por Cdk 5 y GSK3 de forma secuencial (Clayton *et al.*, 2010) también se ha relacionado con la endocitosis mediada por clatrina (Anggono y Robinson, 2007; Evans y Cousin, 2007; Clayton *et al.*, 2009) así como con la endocitosis masiva (Clayton *et al.*, 2010). Aunque es difícil conciliar los datos presentes en la bibliografía del campo, ya que probablemente los ciclos de desfosforilación y refosforilación de la dinamina se den en intervalos temporales muy pequeños, nuestros resultados sugieren que el papel de la calcineurina es más relevante en la endocitosis mediada por clatrina que en la endocitosis masiva, como recientemente

se ha demostrado (Armbruster *et al.*, 2013). De este modo, la inhibición de la calcineurina disminuiría el umbral de la endocitosis masiva, por estar parcialmente inhibida la endocitosis mediada por clatrina. En otras palabras, la capacidad de carga de la endocitosis mediada por clatrina sería fácilmente saturable (Dittman y Ryan, 2009). La resultante sería una puesta en marcha de los fenómenos de endocitosis masiva (asociados a un reciclamiento ineficiente) en una mayor proporción de sinapsis que en condiciones control. Esto es coherente con trabajos anteriores en los que se demuestra, haciendo uso de un mutante puntual en el que las serinas susceptibles de ser fosforiladas en la dinamina se sustituyen por alaninas (S774A/S778A), que la fosforilación de la dinamina es necesaria para llevar a cabo la endocitosis masiva pero no la endocitosis mediada por clatrina (Clayton *et al.*, 2010). Recientemente se ha demostrado que la calcineurina tiene un papel crucial en la gemación de nuevas vesículas desde aquellos endosomas que son capaces de rendir nuevas vesículas competentes para un nuevo evento exocitótico (Cheung y Cousin, 2012; 2013). Estos resultados explicarían parcialmente nuestras observaciones experimentales. La inhibición farmacológica de esta enzima resultaría en un defecto en la gemación de nuevas vesículas desde los endosomas, lo que finalmente daría lugar a un defecto aparente de la eficacia de reciclamiento mayor que en condiciones control, por retención de la fluorescencia contenida en dichos endosomas (Bartolome-Martin *et al.*, 2012). La función del ciclo de desfosforilaciones y refosforilaciones sobre la dinamina sigue siendo enigmático, pues ambos pasos parecen imprescindibles para llevar a cabo los procesos mencionados anteriormente (Clayton *et al.*, 2010; Smillie y Cousin, 2012). En cualquier caso la única manera de explicar este hecho es un proceso dinámico, en el que este ciclo esté implicado en la propia mecánica de endocitosis; una posibilidad atractiva es que estas fosforilaciones/desfosforilaciones tengan algún efecto en el ensamblaje de las proteínas

encargadas de este tipo de endocitosis, es decir, que en la formación de un complejo, la desfosforilación sea necesaria para reclutar una serie de proteínas, y el reclutamiento de otras proteínas, o bien el mantenimiento de dicho complejo sea dependiente de la mencionada refosforilación. Aunque en un primer momento se pensó que los efectos mediados por Cdk5 y calcineurina eran opuestos y su balance determinaba la puesta en marcha de uno u otro tipo de endocitosis (Clayton *et al.*, 2007; Evans y Cousin, 2007) hoy en día se sabe que hay muchas otras quinasas implicadas en la regulación de los fenómenos de endocitosis masiva, tales como la GSK3 (Clayton *et al.*, 2010) o la Akt/PKB (Smillie y Cousin, 2012). El motivo para que la calcineurina haya sido propuesta clásicamente como la principal candidata para poner en marcha la endocitosis masiva, ha sido el hecho de que las elevaciones transitorias de calcio la activarían por medio de la calmodulina. Sin embargo, la calmodulina activa también a la CaMKII, cuyos efectos se han considerado tradicionalmente opuestos (Silva *et al.*, 1992; Groth *et al.*, 2003; Stefan *et al.*, 2008). En cualquier caso, la activación de la calcineurina siempre ha sido asociada a elevaciones menores de calcio que las necesarias para activar la CaMKII, por tanto la asunción de que la calcineurina es el candidato óptimo para desencadenar la endocitosis masiva (Clayton y Cousin, 2009) es parcialmente falaz. Por otro lado, los eventos de fosforilación y desfosforilación de una proteína determinada, pueden acompañar a un fenómeno sin que exista una causalidad vinculante; es decir, el hecho de que la dinamina se desfosforile durante los fenómenos de endocitosis masiva, no necesariamente implica que su desfosforilación sea la causante de la puesta en marcha del mencionado fenómeno. Por tanto, nuestra conclusión es que la endocitosis mediada por clatrina está crucialmente regulada por la proteína calcineurina, mientras que la endocitosis masiva es menos sensible a su inhibición.

7-Posible implicación de los fenómenos de "Kiss&Run" en el reciclamiento o ineficaz

Motivados por las observaciones del grupo de Richard Tsien (Harata *et al.*, 2006) decidimos llevar a cabo una serie de experimentos en los que se trató de dilucidar el impacto de la exocitosis de tipo *kiss and run* en los fenómenos de reciclamiento ineficaz. El azul de bromofenol (conocido como BPB por sus siglas en inglés) es una molécula pequeña (668 Da) capaz de penetrar a través del poro de fusión que se supone se establece durante este modo de exocitosis. La FM1-43, a pesar de ser de menor tamaño que el BPB queda retenida en el lumen de las vesículas por su relativo carácter hidrofóbico, no detectándose una pérdida neta de fluorescencia durante este tipo de exocitosis (Klingauf *et al.*, 1998; Harata *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012). Debido a sus características espectrales y estructurales, el BPB es capaz de disminuir la fluorescencia de FM1-43 por transferencia de energía de resonancia (Harata *et al.*, 2006) constituyendo una herramienta útil para el estudio de este tipo de fenómenos, pues es capaz de acceder al lumen de las vesículas sinápticas durante los fenómenos de *kiss and run* y apagar allí la fluorescencia de la sonda. En nuestro modelo experimental el BPB produjo un cambio drástico en la respuesta cinética media, así como una inversión en la proporción de botones de cada grupo, lo que en principio lleva a pensar en una contribución de los fenómenos de *kiss and run* en los botones caracterizados *a priori* como botones con reciclamiento ineficaz. Sin embargo, también observamos un cambio drástico en las fluorescencias iniciales de los botones en presencia de FM1-43, lo que da lugar a un artefacto matemático a la hora de la normalización. Teniendo en cuenta que ha de existir una cierta proximidad espacial entre las moléculas de BPB y las de FM1-43 para que se produzca el fenómeno del apagamiento, es probable que esta reducción de las fluorescencias iniciales se deba a que determinadas cisternas inducidas por

mecanismos endocitóticos permanezcan en contacto con el espacio extracelular tras 10 minutos de lavado, ya que el BPB comienza a ser perfundido durante los 30 segundos de adquisición de la línea base del experimento. Puesto que no se pudo disecar la contribución de los fenómenos de *kiss and run* y de las formas de endocitosis tardía a la mejoría cinética observada en presencia de BPB, se decidió llevar a cabo un análisis ultraestructural de los terminales presinápticos en distintas condiciones, debido a que los fenómenos de *kiss and run* han de ser ultraestructuralmente indistinguibles. Por tanto, si el defecto subyacente a la ineficacia de reciclamiento tiene que ver con fenómenos de *kiss & run* no se observarían alteraciones ultraestructurales evidentes.

8-Análisis ultraestructural de terminales sinápticos

Mediante microscopia electrónica de transmisión se identificó que las condiciones de estimulación asociadas a una menor eficacia de reciclamiento (1,33mM CaCl_2 durante la fase de carga) estaban asociadas a la aparición de estructuras endosomales en el terminal presináptico. La presencia de estas estructuras fue marginal en condiciones de ausencia de estimulación, de forma acorde con lo previamente descrito (Xu-Friedman *et al.*, 2001; Clayton *et al.*, 2008). Se observó que la estimulación moderada (0,25mM CaCl_2 durante la fase de carga) no generaba este tipo de estructuras, siendo en estas condiciones el reciclamiento vesicular la ruta predominante de endocitosis; estas observaciones son coherentes con trabajos recientes de otros grupos de investigación (Chandrasekar *et al.*, 2013). De estos resultados se puede inferir que las altas intensidades de estimulación ponen en marcha fenómenos de endocitosis masiva asociadas con la recuperación de grandes superficies de membrana presináptica en forma de intermediarios endosomales. Decidimos analizar el efecto de la inhibición de

la dinamina sobre el reciclamiento en el terminal presináptico desde un punto de vista ultraestructural. Para ello emulamos las condiciones de carga en alto y bajo calcio en presencia de dynasore. Se observó que las altas intensidades de estimulación fueron capaces de inducir la aparición de endosomas, pero no se observaron vesículas sinápticas en estas condiciones, sugiriendo que este es un mecanismo independiente de la actividad catalítica de la dinamina (Armbruster *et al.*, 2013). A bajas concentraciones de calcio, la estimulación hipercalémica no produjo estructuras de tipo endosomal; sin embargo, se observó un vaciamiento de vesículas sinápticas en los terminales estimulados a bajas concentraciones de calcio en presencia de dynasore, observándose solo vesículas muy alejadas de la membrana presináptica, que probablemente no llegarán a experimentar el proceso de fusión (Park *et al.*, 2012). Estos resultados son acordes con los obtenidos mediante incorporación de la sonda FM1-43. El dynasore por sí mismo no produjo ningún efecto observable en la ultraestructura de los terminales sinápticos. De lo previamente expuesto se puede concluir que las elevadas intensidades de estimulación ponen en marcha mecanismos de endocitosis masiva asociados con la recuperación de grandes superficies de membrana. Estos mecanismos no participan en el reciclamiento vesicular en condiciones de estimulación más moderadas. La actividad catalítica de la dinamina es prescindible para la recuperación de endosomas pero es necesaria para la recuperación de vesículas sinápticas. Las formas de endocitosis masiva han sido clásicamente asociadas a la posterior gemación de vesículas desde los endosomas, que aseguren la disponibilidad de las mismas ante una nueva ronda de estimulación (Clayton *et al.*, 2008; Cheung y Cousin, 2013) sin embargo también se han descrito formas de endocitosis endosomales no asociadas a la regeneración de vesículas (Perez Bay *et al.*, 2007) tras altas intensidades de estimulación. Nuestros resultados son acordes con esta última hipótesis (Bartolome-Martin *et al.*, 2012), ya que la aparición de

estas estructuras está asociada a bajas eficacias de reciclamiento. Nosotros consideramos que la prioridad de estos mecanismos de endocitosis no es la generación de vesículas competentes para su fusión, sino más bien preservar al terminal presináptico de un incremento deletéreo en la superficie de membrana. El correcto acoplamiento de la exocitosis a la entrada de calcio, así como la compensación de la exocitosis mediante mecanismos de endocitosis está asociada a la integridad de la plataforma de señalización celular que constituye la membrana presináptica y, en concreto, la zona activa (Jahn y Scheller, 2006; Hosoi *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009; Jahn y Fasshauer, 2012; Sudhof, 2012). Un aumento desmesurado del área de membrana presináptica conllevaría el desacoplamiento de estos procesos por deslocalizar los sitios de fusión vesicular (Hosoi *et al.*, 2009), así como los sitios de entrada de calcio. Además, las elevaciones transitorias de calcio serían más duraderas, pues el acoplamiento de los procesos de fusión a la entrada de calcio sería menos eficiente, y la extrusión de calcio del terminal presináptico también sería más costosa en términos energéticos (Kim y von Gersdorff, 2009). Otro efecto potencialmente dañino del incremento de superficie de la membrana presináptica, sería el "derrame" (traducción del inglés *spillover*) de glutamato. La difusión del glutamato a sitios alejados de las plataformas de señalización postsinápticas puede tener consecuencias negativas al activar receptores extrasinápticos (Kullmann *et al.*, 1996; Hardingham *et al.*, 2002). La activación de estos receptores ha sido relacionada con efectos excitotóxicos del glutamato mediados por calpaína (Wei *et al.*, 2012; Vizi *et al.*, 2013). Por tanto, el reciclamiento mediante estas estructuras endocitóticas conllevaría una depresión presináptica estrictamente hablando, relacionada con el agotamiento de vesículas sinápticas y el almacenamiento de su membrana en forma de endosomas. Adicionalmente, se ha propuesto que algunos endosomas puedan funcionar, una vez

internalizados, a modo de plataformas de señalización intracelulares (Cosker *et al.*, 2008; Dang *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012), lo que podría tener relación con los fenómenos observados. No podemos descartar que algunos de los endosomas rindan, por gemación, nuevas vesículas sinápticas como ha sido demostrado por otros grupos de investigación (Cheung y Cousin, 2013). De hecho, en las preparaciones de microscopía electrónica pudimos observar vesículas siendo generadas a partir de estas estructuras; sin embargo, la mayoría de endosomas parecen renuentes a su liberación posterior, como se puede observar en las preparaciones estimuladas a concentraciones fisiológicas de calcio en presencia de dynasore (Bartolome-Martin *et al.*, 2012) a juzgar por las respuestas cinéticas obtenidas en estas condiciones. En cualquier caso, las vesículas generadas por estos mecanismo tardarían más en pasar a formar parte de un pool de vesículas dispuesto a liberarse, pudiendo funcionar este mecanismo a modo de punto de control de mecanismos excitotóxicos en determinadas condiciones fisiopatológicas (Richards *et al.*, 2000; Evans y Cousin, 2007; Clayton y Cousin, 2009; Wenzel *et al.*, 2012). Se puede descartar una contribución mayoritaria de los fenómenos de *kiss & run* al reciclamiento ineficaz debido a la evidencia de alteraciones ultraestructurales.

9- La eficacia de reciclamiento como marcador de maduración

Se ha descrito que la endocitosis masiva puede estar asociada a las vastas remodelaciones de membrana que sufre el cono axonal durante su guía, permaneciendo de forma reminiscente en sinapsis inmaduras (Bonanomi *et al.*, 2008). Con objeto de analizar la eficacia de reciclamiento en función de la maduración neuronal en el cultivo, elegimos tres puntos temporales concretos, 3, 7 y 14 Días *In Vitro* (DIV). Corroboramos la maduración en términos de expresión de proteínas sinápticas, observándose un

aumento de expresión entre 3 y 7 DIV, coherente con el pico de sinaptogénesis en estos cultivos (Mundy *et al.*, 2008; Juranek *et al.*, 2013). Posteriormente la expresión de la mayoría de proteínas sinápticas se estabilizó, manteniéndose estos niveles constantes hasta 14DIV. Las fluorescencias iniciales de las sinapsis presentes en el cultivo, también incrementaron de forma lineal con el tiempo de cultivo, indicando un aumento del pool de vesículas sinápticas, que es coherente con la maduración neuronal (Mozhayeva *et al.*, 2002). Se observó un aumento progresivo de las eficacias de reciclamiento a lo largo de la maduración del cultivo, que además estaba asociado a un aumento de las fluorescencias iniciales, lo que indica que en este caso, el exceso de membrana exocitada durante la estimulación es recuperado mayoritariamente en forma de vesículas sinápticas disponibles para ser liberadas ante una nuevo estímulo, lo que indica que la exocitosis vesicular masiva no induce una saturación de la maquinaria endocitótica. Por tanto, se puede considerar el umbral de saturación de los mecanismos de endocitosis vesicular un marcador de desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo. Existen mecanismos de plasticidad sináptica regulados durante el desarrollo (Al-Hayani y Davies, 2000; Doherty *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2011). Este tipo de endocitosis podría subyacer a formas de plasticidad sináptica relacionadas con la eliminación de contactos funcionales entre las fibras paralelas y las células de Purkinje en los primeros estadios de la sinaptogénesis de estas células; aquellas sinapsis más inmaduras exhibirían una mayor susceptibilidad a la saturación de los mecanismos endocitóticos vesiculares, poniendo en marcha mecanismos de endocitosis masiva antes que las sinapsis maduras. Ante estimulaciones sucesivas, las sinapsis más maduras serían capaces de mantener la fidelidad de la transmisión sináptica, por conservar la integridad de sus vesículas, lo que conllevaría una mayor probabilidad de éxito a la hora de establecer un contacto funcional. Este hecho podría tener implicaciones en la

sinaptogenesis cerebelar *in vivo*. Se ha descrito que la inactivación crónica de los cultivos neuronales produce un efecto homeostático que se traduce, entre otros efectos, en un aumento de expresión de determinadas proteínas presinápticas y en un aumento de la probabilidad de liberación (Turrigiano, 2008; Lazarevic *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012). En nuestro caso, la inactivación crónica del cultivo mediante un tratamiento de 24h con TTx, dio lugar a una inversión de los porcentajes de sinapsis de cada uno de los grupos, indicando un defecto en las eficacias de reciclamiento. La interpretación de estos resultados parte de que un aumento en la probabilidad de liberación daría lugar a un incremento masivo de la exocitosis vesicular durante la fase de incorporación de la sonda, dando lugar a la formación de estructuras de tipo endosomal en un mayor número de botones.

Tratando de establecer una relación mayor entre el estadio de maduración de estas neuronas y su eficacia de reciclamiento vesicular, se llevó a cabo un tratamiento con un fitoestrógeno, la daidzeina, cuyos efectos, asociados a la activación de receptores nucleares PPAR γ , se han relacionado con la maduración neuronal (Chindewa *et al.*, 2008; Sayan-Ozacmak *et al.*, 2011). El efecto que este tratamiento produjo en las células fue un aumento de las eficacias de reciclamiento manifestado como un aumento en el porcentaje de los botones de descarga fuerte. Es interesante destacar que esta mejoría en la eficacia de reciclamiento fue, en este caso, paralela a un incremento de las fluorescencias iniciales de las sinapsis analizadas, pudiéndose descartar a partir de esto que el efecto observado hasta aquí en lo relativo a los botones con baja eficacia de reciclamiento sea un artefacto de la normalización matemática. Estos resultados nos llevan a la conclusión de que la maduración artificial del cultivo también lleva asociada

incrementos en las eficacias de reciclamiento. Por tanto, proponemos que la maduración sináptica es un fenómeno indisociable de la eficacia de reciclamiento vesicular.

10- Marcadores presinápticos y eficacia de reciclamiento

Mediante técnicas de inmunocitoquímica *post-hoc* (Bartolome-Martin *et al.*, 2012; Ramirez-Franco *et al.*, 2013) se trató de establecer una relación entre características intrínsecas de las distintas sinapsis (en términos de expresión de proteínas), y sus eficacias de reciclamiento. Se observó que las mayores eficacias de reciclamiento estaban asociadas a una mayor expresión de una serie de proteínas sinápticas al estudiar sinapsis individuales. Encontramos que en las sinapsis con alta eficacia de reciclamiento existían mayores niveles de: la forma fosforilada de la sinapsina (no existiendo cambios en la expresión total de sinapsina); el factor preparador de vesículas Munc13-1; la fosfatasa calcineurina y la proteína de citomatriz bassoon. Los mayores niveles de estas proteínas son coherentes, desde un punto de vista amplio, con la hipótesis de que el desarrollo está asociado a la regulación de la eficacia de reciclamiento. El aumento de expresión de la calcineurina en aquellas sinapsis con una alta eficacia de reciclamiento es coherente con los resultados obtenidos tras su inhibición farmacológica. Sin embargo, los mayores niveles de Munc13-1 y la forma fosforilada de la sinapsina hacen pensar en que una regulación de los *pools* de vesículas también podría explicar un parte de los efectos observados en experimentos funcionales (Rizzoli y Betz, 2005; Kim y Ryan, 2010; Alabi y Tsien, 2012). No se observaron diferencias en los niveles de expresión de la dinamina, el transportador vesicular de glutamato de tipo 1 (VGluT-1) ni los niveles totales de sinapsina. Como se ha comentado, la dinamina participa en ambos tipos de endocitosis, por tanto no cabe esperar una expresión diferencial de esta

enzima en las distintas subpoblaciones de sinapsis. Sin embargo, observamos bajos niveles de expresión de la subunidad GluA3 de los receptores AMPA en las postsinapsis que estaban en íntima aposición a sinapsis de reciclamiento eficaz. Esta subunidad se ha propuesto en dos estudios como una subunidad característica de sinapsis inmaduras (Condorelli *et al.*, 1993; Incontro *et al.*, 2011). Este dato corrobora la hipótesis de que la eficacia de reciclamiento puede ser entendida como un marcador de maduración neuronal.

11- Receptores presinápticos y maduración neuronal

Con objeto de analizar el papel de los receptores metabotrópicos en la regulación de la maduración neuronal, se diseñaron experimentos en los que se bloqueó la señalización por proteínas G inhibitorias mediante la toxina pertúsica (PTx) durante las 24 horas previas a la realización del cultivo. Se observó un aumento de la eficacia global de reciclamiento en experimentos funcionales, acompañada de un aumento en el número de botones por la unidad de longitud y una disminución de las fluorescencias iniciales. El incremento de botones en la unidad de longitud se interpreta como un efecto homeostático que en cierto modo sería opuesto al que media la TTx, una inactivación sostenida de la señalización por proteínas G inhibitorias conlleva finalmente un descenso en la probabilidad de liberación, esto se manifiesta en un menor número de vesículas exocitadas durante la fase de incorporación de la sonda y, por tanto, en una reducción de las fluorescencias iniciales. Entendemos que esta reducción de las fluorescencias iniciales subyace a la mejoría observada en lo que se refiere a las eficacias de reciclamiento. Sin embargo, la aparición de un mayor número de botones sinápticos en estas condiciones sugiere que la PTx actúa promoviendo la sinaptogénesis.

Teniendo en cuenta que hay un mayor número de sinapsis con un contenido vesicular menor, no podemos descartar que estas se hayan originado a partir de difusión de vesículas desde sinapsis adyacentes (Darcy *et al.*, 2006; Fernandez-Alfonso y Ryan, 2008; Staras *et al.*, 2010), lo cual explicaría en parte las menores fluorescencias iniciales, la mayor eficacia de reciclamiento (por no llegar a saturarse la maquinaria endocitótica) y el mayor número de sinapsis. Uno de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G inhibitorias más abundantes en el encéfalo de mamíferos y, en concreto, en neuronas granulares de cerebelo, es el receptor CB1 (Kano *et al.*, 2009; Stephens, 2009). Por este motivo decidimos emplear el receptor CB1 como diana farmacológica para tratar de emular los efectos farmacológicos de la PTx, para lo que se empleó el antagonista del receptor CB1 SR141716. Observamos una mejoría evidente de las eficacias de reciclamiento; sin embargo, al contrario de lo que sucedió con la PTx no se observó un aumento en el número de botones ni en las fluorescencias iniciales. Nuestra hipótesis es que la inhibición de la señalización mediada por cannabinoides no es suficiente para promover un efecto homeostático; sin embargo existe un efecto neto sobre la exocitosis monitorizada durante el experimento. Estas observaciones dieron lugar a la segunda parte de esta disertación, pues nuestro siguiente objetivo fue caracterizar en qué medida el SR141716 podía llegar a tener un efecto durante la exocitosis monitorizada en el experimento de imagen, lo que sugeriría la función crucial del receptor CB1 en la regulación de la exocitosis de estas neuronas.

12- Regulación de la liberación vesicular por el receptor CB1. Silenciamiento sináptico

La expresión de este receptor, así como su correcta localización en presinapsis se corroboraron en experimentos de *western blot* e inmunocitoquímica, respectivamente. Se detectó expresión del receptor a 3, 7 y 14 DIV y su correcta localización a 7DIV, por co-localización con el marcador vesicular sinaptofisina, de forma contraria a lo descrito por otros grupos en estas condiciones de cultivo (Vallano *et al.*, 2006). Para disecar exclusivamente los efectos que la activación de este receptor mediaba sobre la exocitosis vesicular, se diseñaron una serie de experimentos en los que se incubaron las células con un agonista cannabinoide, el HU-210, durante los 10 minutos posteriores a la fase de carga. Se llevaron a cabo protocolos secuenciales de estimulación constituidos por una estimulación corta (10 segundos) seguida de un intervalo en reposo y una estimulación final larga (2 minutos). El objeto de las estimulaciones secuenciales fue detectar una inhibición calcio dependiente de la liberación que pudiese ser contrarrestada mediante periodos de estimulación sostenida. Observamos que las incubaciones prolongadas con HU-210 daban lugar a un defecto de la liberación vesicular que no podía ser contrarrestado mediante periodos de estimulación prolongada, lo que indicaba que, posiblemente, un fenómeno parcialmente calcio independiente subyacía a la inhibición mediada por este receptor. Encontramos que se requerían tiempos prolongados de estimulación del receptor para inducir una reducción exocitótica en nuestras condiciones experimentales, ya que, a tiempos cortos de incubación (40"), no se observó ningún cambio en el comportamiento cinético de las sinapsis en experimentos de FM1-43. La principal limitación metodológica de la sonda FM1-43 es la necesidad de una estimulación previa para introducir la sonda en el interior de las vesículas sinápticas, lo que podría poner en marcha la síntesis de

cannabinoides endógenos (Devane *et al.*, 1992; Di Marzo *et al.*, 1994) que ocluyese parcialmente los efectos observados. Con objeto de eludir esta limitación se llevaron a cabo experimentos con un indicador de exo/endocitosis codificado en una proteína modificada por técnicas de biología molecular que se introduce por electroporación en las células de interés, la VGluT1-pHluorina (Voglmaier *et al.*, 2006). Además, esto nos permitió llevar a cabo un pulso control previo a la incubación con HU-210, del que se puede extraer un control interno para cada una de las respuestas individuales para su posterior comparación. Como esperábamos se observó una reducción dramática de la exocitosis tras una incubación de 10 minutos con el agonista cannabinoide que no pudo ser reproducida en tiempos cortos de incubación con el agonista. Se observó que la abolición de la exocitosis era total en una subpoblación de botones, esto se identificó como una respuesta inferior a los niveles de ruido. A estos botones se les denominó botones silentes, por ser este un término recientemente acuñado en la bibliografía del campo para definir a aquellos botones que no muestran respuesta exocitótica alguna ante la estimulación a pesar de contener un número de vesículas normal y de mostrar una composición similar a la de los botones activos (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006; Cousin y Evans, 2011; Crawford *et al.*, 2012; Crawford y Mennerick, 2012). Tras una incubación de 10 minutos con HU-210, aproximadamente un 30 % de las sinapsis presentes en el campo de observación, mostraron este comportamiento. En experimentos de triple pulso se encontró que únicamente las incubaciones prolongadas con el agonista daban lugar a esta reducción exocitótica.

13-Independencia de calcio del fenómeno de silenciamiento

Dado que el efecto sobre la liberación vesicular inducido por el agonista cannabinoide no pudo contrarrestarse con periodos prolongados de estimulación, decidimos analizar en qué medida dicho fenómeno era calcio independiente. En primer lugar, decidimos llevar a cabo un análisis de la calcio independencia de la exocitosis en nuestro sistema de cultivo. Para ello se diseñaron experimentos de doble pulso en los que se estimuló mediante perfusión hipercalémica a distintas concentraciones de calcio. Se observó una relación directamente proporcional entre la concentración de calcio y el porcentaje de fluorescencia normalizada (fracción de vesículas liberadas) exhibido por las distintas sinapsis. También se observaron diferencias de las constantes temporales de endocitosis, siendo este fenómeno más rápido a menores concentraciones de calcio, lo que probablemente se deba a la saturación de la maquinaria endocitótica a altas concentraciones de calcio (Dittman y Ryan, 2009). No observamos diferencias relativas a la velocidad de exocitosis, probablemente por estar saturados los sensores de calcio para este fenómeno incluso a bajas concentraciones de calcio, al emplear estimulación hipercalémica, que conlleva un flujo constante de este ión en el interior de los terminales. Posteriormente, se diseñaron experimentos tratando de reproducir los resultados obtenidos a concentraciones fisiológicas de calcio en presencia de 5mM CaCl_2 en el medio extracelular. El porcentaje de botones susceptibles de ser silenciado en estas condiciones experimentales fue de aproximadamente un 25 %, no mostrando diferencias significativas con el porcentaje encontrado a concentraciones fisiológicas de calcio. Puesto que habíamos encontrado una cierta tendencia a la reducción exocitótica en experimentos de doble pulso a altas concentraciones de calcio, llevamos a cabo este experimento en ausencia del primer pulso de estimulación. Se observó una marcada reducción de la exocitosis neuronal y un grado de silenciamiento similar al observado

en experimentos de doble pulso, lo cual pone de manifiesto la parcial calcioindependencia de este fenómeno. Se observó además una reducción de las constantes temporales de endocitosis (aceleración del proceso) tras la activación del receptor CB1, probablemente explicable porque a estas concentraciones de calcio existe una saturación de la capacidad de carga del proceso endocitótico en condiciones control, que no se alcanza al tratar con HU-210, por el defecto exocitótico previo que ello conlleva (Dittman y Ryan, 2009; Hosoi *et al.*, 2009). Mediante experimentos de imagen de calcio con el indicador ratiométrico FURA-2 AM, se constató que la activación del receptor CB1 durante periodos cortos (1 min) fue capaz de inducir una reducción de la entrada de calcio en los terminales presinápticos que no era paralela a una reducción exocitótica. El tratamiento prolongado con HU-210 (10 min) también generó una inhibición de la entrada de calcio en el terminal presináptico. En estas condiciones, dicha reducción sí se acompañaba de una reducción en la fracción de vesículas liberadas, siendo este el argumento definitivo que nos permite disociar la inhibición de la entrada de calcio de la reducción exocitótica mediada por la activación del receptor CB1.

Es posible que, debido a la intensidad de la estimulación hipercalémica, la cooperatividad de la exocitosis esté ya saturada a concentraciones fisiológicas de calcio en nuestras condiciones experimentales, lo que sería otro argumento a favor de la calcio-independencia parcial de la reducción exocitótica mediada por HU-210. Existe descrito un efecto de oclusión sobre la potenciación mediada por PDBu a concentraciones de calcio e intensidades de estimulación que saturen la cooperatividad del proceso exocitótico (Lou *et al.*, 2005); a priori, este tipo de condiciones experimentales serían óptimas para evaluar el fenómeno de silenciamiento, pues este no

se vería enmascarado por una baja probabilidad de liberación. Para corroborar este hecho, se diseñaron experimentos de doble pulso a 0,25mM y a 1,33mM CaCl_2 . Se observó que las concentraciones fisiológicas de calcio ocluían el efecto potenciador del PDBu, indicando que las concentraciones fisiológicas de calcio y la estimulación con potasio son un estímulo suficientemente fuerte para evaluar el fenómeno de silenciamiento sináptico (Cousin y Evans, 2011). Se observó potenciación del PDBu a concentraciones de calcio inferiores a las fisiológicas; esto se manifestó en el hecho de que los botones con menor probabilidad de liberación experimentaron una respuesta virtualmente silente en estas condiciones de estimulación, que pudo ser potenciada tras la aplicación de PDBu. Estos fenómenos de reclutamiento de botones previamente inactivos es coherente con un aumento en el número de vesículas competentes para el proceso de fusión, probablemente inducido por la activación de la proteína Munc13-1 (Rhee *et al.*, 2002) y es acorde a los resultados previos de otros grupos (Chang *et al.*, 2010). De estos resultados se concluye que la estimulación hipercalémica a concentraciones fisiológicas de calcio (1,33mM) es una aproximación experimental válida para el estudio farmacológico posterior del fenómeno del silenciamiento sináptico, pues una disminución en la probabilidad de liberación vesicular no debería enmascarar el fenómeno de silenciamiento sináptico en estas condiciones de estimulación (Cousin y Evans, 2011).

14-Análisis ultraestructural del fenómeno de silenciamiento sináptico

Puesto que se observó una persistencia del fenómeno de silenciamiento a concentraciones suprafisiológicas de calcio, decidimos llevar a cabo un análisis ultraestructural de los terminales sinápticos tras el tratamiento con HU-210, para detectar posibles modificaciones en la distancia de las vesículas sinápticas a la membrana de la zona activa. Esta aproximación se llevó a cabo en dos modelos experimentales distintos. Se observó una retracción de las vesículas más cercanas a la membrana de la zona activa tras el tratamiento de 10 minutos con HU-210. Esta retracción se observó tanto en células granulares de cerebelo en cultivo, como en sinaptoneurosomas que provenían de ratones silvestres, pero no en sinaptosomas provenientes de ratones carentes del receptor CB1 (*cnr1*^{-/-}). Este defecto posicional de las vesículas sinápticas podría subyacer, al menos parcialmente, al efecto inhibitorio del HU-210. La ausencia de efecto en sinaptoneurosomas carentes del receptor CB1 sugiere que la potencial señalización vía CB2 del HU-210 no está implicada en este fenómeno. El número de vesículas en la cercanía de la membrana presináptica se encontró ligeramente aumentado en los ratones carentes del receptor CB1, lo que podría estar indicando un papel de la señalización tónica por endocannabinoides en condiciones fisiológicas (Foldy *et al.*, 2013). Estas observaciones se asemejan a las llevadas a cabo en mutantes de proteínas relacionadas con el proceso de preparación y anclaje de las vesículas sinápticas (Gracheva *et al.*, 2008; Siksou *et al.*, 2009; Kaeser *et al.*, 2011), lo que sugiere un posible efecto de los cannabinoides sobre la maquinaria de liberación vesicular (Castillo *et al.*, 2012).

15-Redistribución de los *pools* de vesículas sinápticas mediada por la activación de CB1

Los experimentos llevados a cabo en presencia de bafilomicina, un inhibidor de la V-ATPasa y por tanto de la re-acidificación vesicular tras la endocitosis, permiten hacer estimaciones de la fracción de vesículas pertenecientes al pool de reciclamiento. Se observó que el HU-210 producía una reducción del número de vesículas susceptibles de ser exocitadas a todas las concentraciones de calcio ensayadas (0,25mM; 1,33mM y 5mM), lo que sugiere que el mecanismo por el que la activación del receptor CB1 disminuye el número de vesículas competentes para el proceso de fusión es parcialmente dissociable de la disminución de la entrada de calcio en los terminales. El número de botones silentes también aumentó tras el tratamiento con HU-210 a todas las concentraciones de calcio ensayadas, este aumento fue mucho mayor a concentraciones bajas de calcio, probablemente porque a estas concentraciones, la inhibición de la entrada de calcio tenga un efecto más drástico sobre la probabilidad de liberación.

16- Farmacología del fenómeno de silenciamiento

En primer lugar se decidió corroborar que la activación del receptor CB1 daba lugar a una disminución de los niveles de cAMP en nuestras condiciones experimentales. Se observó una reducción de aproximadamente un 40% de los niveles de cAMP tras un tratamiento prolongado con HU-210, estos resultados están en discrepancia con lo previamente descrito para estas células en estas condiciones de cultivo, probablemente por variaciones en el protocolo de cultivo (Vallano *et al.*, 2006). Posteriormente se decidió trasladar estas observaciones a los experimentos funcionales. En primer lugar observamos una prevención del efecto del HU-210, por la incubación con forskolina, un

activador de la adenilato ciclasa; este resultado pone de manifiesto que la reducción exocitótica observada tras la activación sostenida del receptor CB1 es inducida por una disminución en los niveles de cAMP (Chevaleyre *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2008). La prevención del silenciamiento se observó al llevar a cabo estos mismos experimentos en presencia de H-89, un inhibidor de la PKA, lo que sugiere que la reducción en los niveles de cAMP inducida por cannabinoides tiene efectos dissociables de la disminución de la actividad de PKA. Es importante destacar que los efectos sobre la fracción vesicular exocitada en respuesta a la estimulación no pudieron ser revertidos totalmente en presencia de H-89. Posteriormente, decidimos usar un activador selectivo de la PKA tratando de contrarrestar el defecto exocitótico inducido por la activación del receptor CB1; el activador de la PKA no fue capaz de disminuir el número de botones silentes encontrado tras el tratamiento con HU-210 y sólo revirtió parcialmente los efectos exocitóticos, sugiriendo que el mecanismo por el que la forskolina disminuye el número de respuestas que muestran este comportamiento tras el tratamiento con HU-210 es parcialmente independiente de la PKA. Además de la PKA, existen otras dianas moleculares reguladas por las concentraciones de cAMP (Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2006; Efetova *et al.*, 2012). La proteína EPAC, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina activado por cAMP, ha sido propuesta como candidata en la regulación de la fusión de vesículas en numerosos sistemas secretorios (Schmidt *et al.*, 2001; Branham *et al.*, 2009) así como en terminales presinápticos (Sakaba y Neher, 2003; Gekel y Neher, 2008; Ferrero *et al.*, 2013). La activación de esta proteína con su activador selectivo, el 8-pCpt, revirtió los efectos del HU-210 en lo que al silenciamiento sináptico se refiere. Estos resultados nos llevan a concluir que el silenciamiento sináptico opera por una ruta mecanísticamente distinta a la inhibición de la PKA y dependiente de la disminución de los niveles de actividad de la proteína EPAC. En un estudio previo se encontró que el

8pCpt promovía el reclutamiento de neuronas previamente inactivas; sin embargo, en este estudio se atribuyó esta activación a efectos inespecíficos de este compuesto sobre la actividad de la PKA (Cousin y Evans, 2011). Se ha descrito que la proteína EPAC podría estar formando un complejo con piccolo y RIM 2 (Ozaki *et al.*, 2000; Kashima *et al.*, 2001; Fujimoto *et al.*, 2002); por otro lado, la interacción entre RIM y Rab3 puede regularse por el tipo de nucleótido de guanina unido a Rab3 (Wang *et al.*, 1997; Dulubova *et al.*, 2005) y se ha descrito que la proteína EPAC puede promover la forma Rab3-GTP (Branham *et al.*, 2009). En este escenario molecular, una disminución de los niveles de cAMP podría tener un impacto crucial en la regulación de la forma Rab3-GTP, lo que conllevaría un defecto en el posicionamiento y la preparación de las vesículas sinápticas.

17-Reversibilidad del proceso de silenciamiento. Implicaciones en la plasticidad

Para distinguir entre un fenómeno de plasticidad y un fenómeno de eliminación definitiva de sinapsis funcionales, decidimos realizar experimentos para comprobar si, una vez silenciadas, las sinapsis podían recuperar su funcionalidad tras varios minutos en ausencia de activación del receptor CB1. Se observó que el fenómeno de silenciamiento revertía de forma espontánea tras un periodo de 10-20 minutos en reposo. Esta es una observación importante, pues disipa dudas acerca de la localización subcelular de estas regiones fluorescentes, demostrando que son sinapsis inactivadas, y no orgánulos de la vía secretora, que pudiesen rendir fluorescencia tras la alcalinización química. Además, los resultados que se derivan de esta tanda de experimentos demuestran que el silenciamiento que algunas sinapsis experimentan tras periodos prolongados de exposición a un agonista cannabinoide constituye un proceso de

plasticidad dinámico, pudiendo ser modulado bidireccionalmente en periodos de tiempo relativamente cortos; esto añade un valor adicional al estudio, pues también se puede descartar una pérdida de funcionalidad de la preparación. Se observó que a tiempos inferiores a los 10 minutos de recuperación, la mayoría (70% aproximadamente) de las sinapsis silenciadas por el agonista cannabinoide permanecían aún inactivas, lo que nos permitió diseñar una aproximación farmacológica con el objeto de comprobar si el activador de la proteína EPAC era capaz de revertir este proceso a tiempos cortos, de forma posterior a su inducción. La activación de la proteína EPAC produjo una reversión del fenómeno de silenciamiento en los 4 minutos posteriores a la incubación con el agonista cannabinoide. Estos resultados indican que la disminución de los niveles de cAMP, operando mediante la reducción en la actividad de la proteína EPAC, induce un tipo de depresión profunda y transitoria mediada por endocannabinoides en sinapsis glutamatérgicas de neuronas de cerebelo en cultivo. El comportamiento que muestran estas sinapsis en respuesta a una estimulación de gran intensidad, en este caso por perfusión hipercalémica, es acorde con la definición de sinapsis silentes aunque en este caso el fenómeno no muestra la persistencia descrita por otros autores (Moulder *et al.*, 2004; Moulder *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2011). Esto es explicable, porque, aunque se puedan definir ambos como aquellos botones que muestran una ausencia de fusión vesicular en respuesta a la estimulación, probablemente los protocolos empleados por otros grupos lleven a una eliminación definitiva, no plástica, de sinapsis funcionales (Moulder *et al.*, 2004), mientras que el fenómeno que aquí se describe probablemente subyazca a mecanismos de plasticidad modulables bidireccionalmente.

Para entender la relevancia de este proceso debemos acudir al contexto fisiológico en que esta sinapsis se encuadra. Los modelos empleados para estudiar el cerebelo se basan en el concepto de filtro adaptativo. Estos dispositivos, empleados en ingeniería, se definen como dispositivos que intentan modelar la relación entre señales, en tiempo real y de forma iterativa. A diferencia de otros dispositivos, los algoritmos que rigen los coeficientes (pesos sinápticos al hacer la analogía en el cerebelo) de un filtro adaptativo son dinámicos, es decir, varían en función del tiempo, intentando ajustar la señal de salida del sistema en función de un error, que, en el caso del cerebelo, parece ser codificado por las fibras trepadoras (Porrill y Dean, 2008; Dean *et al.*, 2010). Esta es la razón por la que es un modelo adaptativo, porque en función de la entrada de información por la fibra trepadora, puede ajustar los pesos sinápticos (coeficientes) de este dispositivo, codificados en este caso en la sinapsis existente entre la fibra paralela y la célula de Purkinje (Fujita, 1982; Dean *et al.*, 2010). Siguiendo la predicción de la regla de aprendizaje de la covarianza (Sejnowski, 1977) una activación de una sinapsis de una fibra paralela sobre una célula de Purkinje, que dé lugar a una activación concomitante de la fibra trepadora (componente de error), experimentará un proceso de depresión a largo plazo; lo que es lo mismo, la activación de un determinado comando motor que dé lugar a un error sensitivo (la acción se ha ejecutado de forma poco precisa), conllevará una distribución a la baja del peso sináptico de esta conexión; esta predicción se ha demostrado experimentalmente (Ito, 1989; Safo y Regehr, 2005). Teniendo en cuenta la unidad de procesamiento del cerebelo, la información aferente paralela a la ejecución de un determinado comando motor ha de venir codificada en varias fibras paralelas. Eventualmente, algunas de estas fibras paralelas pueden contener información irrelevante para la ejecución de la orden motora deseada, lo que conllevaría una reducción del peso sináptico de la citada conexión, pues su activación sería

coincidente con la de la fibra trepadora. ¿Qué mecanismos celulares podrían subyacer a esto? Ha de tenerse en cuenta que la activación de ambas fibras sobre la neurona de Purkinje, conllevará una mayor despolarización de esta neurona, lo que podría guardar relación con una mayor síntesis de endocannabinoides tras una activación concomitante de ambas sinapsis (Hashimotodani *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005; Hashimotodani *et al.*, 2007); por tanto la inactivación total de determinadas sinapsis (silenciamiento) de las fibras paralelas podría tener implicaciones cruciales en el aprendizaje motor (Isope y Barbour, 2002; Dean *et al.*, 2010). Curiosamente, el estudio post-mortem de pacientes autistas revela una pérdida de neuronas de Purkinje en el cerebelo de estos pacientes (Bailey *et al.*, 1998; Abrahams y Geschwind, 2010) que se ha relacionado con los déficits motores de estos pacientes (Fatemi *et al.*, 2012). Recientemente se ha postulado que mutaciones del gen de la neuroligina 3, que producen un fenotipo de autismo en ratones, están asociadas a un defecto de la señalización tónica por endocannabinoides (Foldy *et al.*, 2013). En este contexto un fallo en la señalización tónica por endocannabinoides podría subyacer a una elevada probabilidad de liberación en sinapsis entre la fibra paralela y la célula de Purkinje, con las consecuentes limitaciones en aprendizaje motor y las posibles implicaciones en la muerte neuronal del mencionado tipo celular, que podrían guardar relación con la etiología de síntomas motores en el autismo (Krueger y Brose, 2013).

Otra de las implicaciones importantes de la transitoriedad de este fenómeno es su paralelismo con la LTD inducida por endocannabinoides en las sinapsis entre la fibra paralela y la neurona de Purkinje (Kreitzer y Regehr, 2001; Safo y Regehr, 2005; Carey *et al.*, 2011). Como se ha demostrado, la activación del receptor CB1 no es suficiente *per se* para el mantenimiento de la LTD en esta sinapsis, y sin embargo es una

condición indispensable para su inducción (Safo y Regehr, 2005; Carey *et al.*, 2011). La aplicación de un agonista del receptor CB1 en rodajas de cerebelo, genera una disminución pronunciada de los EPSCs (del inglés *Excitatory Post-Synaptic Currents*) registrados en las células de Purkinje tras la activación de un fascículo de fibras paralelas por estimulación de campo en la capa molecular que es revertida al co-aplicar un antagonista del receptor (Safo y Regehr, 2005). Teniendo en cuenta la baja probabilidad de liberación de estas células *in vivo* (Dittman *et al.*, 2000), es plausible concebir que la inducción de la LTD mediada por cannabinoides venga determinada por una reducción en la exocitosis, que llegue a implicar en algunos casos el silenciamiento sináptico (Safo y Regehr, 2005; Qiu y Knopfel, 2009; Carey *et al.*, 2011). Es difícil definir una ausencia total de exocitosis mediante experimentos de electrofisiología, pues, dadas las características anatómicas de estas sinapsis las medidas de los EPSCs en la célula de Purkinje suelen provenir de más de un punto de contacto entre varias fibras paralelas y una célula de Purkinje (Safo y Regehr, 2005). Sin embargo, en un estudio se llevaron a cabo medidas de sinapsis unitarias entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (Isope y Barbour, 2002). Se encontró que, en ratas adultas, la gran mayoría de las conexiones no eran capaz de inducir una respuesta medible; los autores atribuyen este hecho a un fenómeno postsináptico, pues la transmisión del potencial de acción así como la probabilidad de liberación de las sinapsis activas eran normales; el papel de la señalización por calcio no es analizado en este trabajo (Isope y Barbour, 2002). Sin embargo, conceptualmente, los autores proponen que las propiedades de esta sinapsis posibilitan, mediante el aprendizaje, que una determinada célula de Purkinje pueda "decidir las entradas de información (fibras paralelas) que puedan inducir en ella una respuesta" (Isope y Barbour, 2002). Si el aprendizaje cerebelar se basa en una inactivación de determinadas sinapsis de la fibra paralela sobre determinadas células de

Purkinje (Porrill y Dean, 2008; Dean *et al.*, 2010) el fenómeno de silenciamiento sináptico mediado por cannabinoides podría subyacer a las fases iniciales del aprendizaje motor mediado por el cerebelo, lo que podría explicar los efectos comportamentales encontrados tras la aplicación de un agonista cannabinoide a animales vivos (DeSanty y Dar, 2001; Patel y Hillard, 2001; Skosnik *et al.*, 2008) y las observaciones hechas en consumidores humanos (Roser *et al.*, 2009; Batalla *et al.*, 2013).

18- Determinantes presinápticos de la susceptibilidad al silenciamiento

Como última parte del estudio, se llevó a cabo un análisis para intentar determinar si existían características intrínsecas a las sinapsis que nos permitieran diferenciar entre las distintas susceptibilidades de estas al fenómeno de silenciamiento. Haciendo uso de la técnica de inmunocitoquímica *post-hoc* (Ramirez-Franco *et al.*, 2013), se detectó que las sinapsis susceptibles de ser silenciadas eran aquellas con una mayor proporción de receptor CB1 y una menor proporción de la proteína RIM1 α (expresado como un menor cociente entre la inmunorreactividad normalizada de RIM1 α y la del receptor CB1). Esta relación solo era válida para la proteína RIM1 α , no encontrándose asociación entre la susceptibilidad al silenciamiento y el cociente entre las IR de Munc13-1 y el receptor CB1. Esto es compatible con una posible relación entre los niveles de cAMP y el contenido de Rab3A-GTP, ya que cuanto menor sea el contenido de RIM en una sinapsis, más evidente, en lo que al número de vesículas disponibles para ser liberadas se refiere, sería el efecto de un descenso en los niveles de Rab3A-GTP. Se ha demostrado, en sistemas neuronales y no-neuronales, el vínculo entre la activación de EPAC y el contenido Rab3A-GTP (Branham *et al.*, 2009; Ferrero *et al.*, 2013). Las

funciones de Munc13-1 son dependientes de su estado de activación. Esta proteína se regula por su interacción con diacilglicerol (Rhee *et al.*, 2002), así como por calcio (Shin *et al.*, 2010) y calmodulina (Junge *et al.*, 2004). Además, la proteína RIM interfiere en el estado de activación de Munc13, por disociación del homodímero de Munc13-1, que no es activo (Kaeser *et al.*, 2011). Nuestra interpretación de este resultado negativo es que los niveles totales de esta proteína (estimada en este caso como una medida de inmunorreactividad), no dan cuenta de la fracción de esta proteína que es efectiva, por la existencia de múltiples mecanismos reguladores.

VI- Conclusiones

"No es bueno repetir lo que está dicho. Después de haber hablado, de haber vertido lágrimas, silencio y sonreído: nada es lo mismo.

Habrán palabras nuevas para la nueva historia y es preciso encontrarlas antes de que sea tarde"

Ángel González

VI-Conclusiones

1.1- Endocitosis y reciclamiento

- a) Las estimulaciones de alta intensidad ponen en marcha mecanismos de recuperación de membrana cuya función principal no es la regeneración de vesículas sinápticas dispuestas a su liberación sino la disminución del área de la membrana presináptica. A consecuencia de ello, estos mecanismos están asociados a un reciclamiento sináptico ineficaz y a la aparición de estructuras endosomales.
- b) Los mecanismos de endocitosis masiva persisten tras la estimulación y son independientes de la actividad catalítica de la dinamina, pero requieren su localización en la membrana plasmática.
- c) La inhibición de la calcineurina desplaza las formas de endocitosis hacia formas de reciclamiento ineficaz.
- d) Los mecanismos ineficaces de endocitosis están regulados durante el desarrollo siendo predominantes en estadios inmaduros de los cultivos neuronales y estando asociados a los terminales con una menor inmunorreactividad de determinadas proteínas sinápticas.

1.2 Exocitosis

e) La activación persistente del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1R) desencadena una reducción drástica de la exocitosis que implica el silenciamiento sináptico de una subpoblación de terminales.

f) El mecanismo que subyace al silenciamiento mediado por cannabinoides es independiente de la inhibición de la entrada de calcio, pero dependiente de una reducción en los niveles de cAMP.

g) Los mecanismos de silenciamiento son independientes de la reducción de los niveles de actividad de la proteína quinasa A (PKA) pero dependientes de la disminución de la actividad de la proteína EPAC.

h) El silenciamiento sináptico mediado por cannabinoides cursa con una retracción de las vesículas más cercanas a la membrana de la zona activa.

i) La susceptibilidad al silenciamiento sináptico viene determinada por características intrínsecas a las distintas sinapsis en lo que a composición de proteínas se refiere.

VII- Bibliografía

"Leer es pensar con el cerebro ajeno en lugar de hacerlo con el
propio"

A. Schopenhauer

VI-Bibliografía

- Abrahams, B.S. & Geschwind, D.H. (2010) Connecting genes to brain in the autism spectrum disorders. *Arch Neurol*, **67**, 395-399.
- Adermark, L. & Lovinger, D.M. (2007) Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20564-20569.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. & Takeda, J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, **74**, 2622-2625.
- Al-Hayani, A. & Davies, S.N. (2000) Cannabinoid receptor mediated inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice is developmentally regulated. *Br J Pharmacol*, **131**, 663-665.
- Alabi, A.A. & Tsien, R.W. (2012) Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a013680.
- Alabi, A.A. & Tsien, R.W. (2013) Perspectives on Kiss-and-Run: Role in Exocytosis, Endocytosis, and Neurotransmission. *Annu Rev Physiol*, **75**, 393-422.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., Valero, V., Lindau, M. & Alvarez de Toledo, G. (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol*, **1**, 40-44.
- Altman, J. & Bayer, S.A. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol*, **179**, 23-48.
- Altman, J. & Bayer, S.A. (1997) *Development of the cerebellar system : in relation to its evolution, structure, and functions*. CRC Press, Boca Raton.
- Altman, J. & McCrady, B. (1972) The influence of nutrition on neural and behavioral development. IV. Effects of infantile undernutrition on the growth of the cerebellum. *Dev Psychobiol*, **5**, 111-122.
- Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. & Fernandez, J.M. (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, **363**, 554-558.

- Andersson, F., Jakobsson, J., Low, P., Shupliakov, O. & Brodin, L. (2008) Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J Neurosci*, **28**, 3925-3933.
- Ando, R.D., Biro, J., Csolle, C., Ledent, C. & Sperlagh, B. (2012) The inhibitory action of exo- and endocannabinoids on [(3)H]GABA release are mediated by both CB(1)and CB(2)receptors in the mouse hippocampus. *Neurochem Int*, **60**, 145-152.
- Andrews, J., Smith, M., Merakovsky, J., Coulson, M., Hannan, F. & Kelly, L.E. (1996) The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics*, **143**, 1699-1711.
- Anggono, V. & Robinson, P.J. (2007) Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurochem*, **102**, 931-943.
- Anggono, V., Smillie, K.J., Graham, M.E., Valova, V.A., Cousin, M.A. & Robinson, P.J. (2006) Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat Neurosci*, **9**, 752-760.
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. & Schneider, T.R. (2002) Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol*, **9**, 107-111.
- Antonny, B. (2006) Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 386-394.
- Apps, R. & Hawkes, R. (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 670-681.
- Ariel, P. & Ryan, T.A. (2010) Optical mapping of release properties in synapses. *Front Neural Circuits*, **4**.
- Armbruster, M., Messa, M., Ferguson, S.M., De Camilli, P. & Ryan, T.A. (2013) Dynamin phosphorylation controls optimization of endocytosis for brief action potential bursts. *Elife*, **2**, e00845.
- Augustine, G.J., Santamaria, F. & Tanaka, K. (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron*, **40**, 331-346.
- Azad, S.C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B.F., Lutz, B., Zieglgansberger, W. & Rammes, G. (2004) Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J Neurosci*, **24**, 9953-9961.
- Baba, T., Damke, H., Hinshaw, J.E., Ikeda, K., Schmid, S.L. & Warnock, D.E. (1995) Role of dynamin in clathrin-coated vesicle formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 235-242.

- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M. & Lantos, P. (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain*, **121** (Pt 5), 889-905.
- Balaji, J. & Ryan, T.A. (2007) Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20576-20581.
- Barneda-Zahonero, B., Servitja, J.M., Badiola, N., Minano-Molina, A.J., Fado, R., Saura, C.A. & Rodriguez-Alvarez, J. (2012) Nurr1 protein is required for N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor-mediated neuronal survival. *J Biol Chem*, **287**, 11351-11362.
- Bartolome-Martin, D., Ramirez-Franco, J., Castro, E., Sanchez-Prieto, J. & Torres, M. (2012) Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci*, **125**, 422-434.
- Batalla, A., Bhattacharyya, S., Yucel, M., Fusar-Poli, P., Crippa, J.A., Nogue, S., Torrens, M., Pujol, J., Farre, M. & Martin-Santos, R. (2013) Structural and functional imaging studies in chronic cannabis users: a systematic review of adolescent and adult findings. *PLoS One*, **8**, e55821.
- Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., De Camilli, P. & Jahn, R. (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J*, **8**, 379-384.
- Beck, K.A. & Keen, J.H. (1991) Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem*, **266**, 4442-4447.
- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Jr. & Edwards, R.H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, **289**, 957-960.
- Benard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenco, J., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mulle, C., Ortega-Gutierrez, S., Martin-Fonoteca, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., Lopez-Rodriguez, M.L., Grandes, P., Rossignol, R. & Marsicano, G. (2012) Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci*, **15**, 558-564.
- Bender, V.A., Bender, K.J., Brasier, D.J. & Feldman, D.E. (2006) Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci*, **26**, 4166-4177.
- Bennett, M.K., Calakos, N. & Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **257**, 255-259.
- Bergsman, J.B., Krueger, S.R. & Fitzsimonds, R.M. (2006) Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta. *J Neurosci Methods*, **152**, 32-39.

- Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Sudhof, T.C., Rettig, J. & Brose, N. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron*, **21**, 123-136.
- Betz, W.J. & Angleson, J.K. (1998) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Physiol*, **60**, 347-363.
- Betz, W.J. & Bewick, G.S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, **255**, 200-203.
- Biederer, T. (2006) Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*, **87**, 139-150.
- Billups, B. & Forsythe, I.D. (2002) Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci*, **22**, 5840-5847.
- Birks, R.I. & Fitch, J.G. (1974) Storage and release of acetylcholine in a sympathetic ganglion. *J Physiol*, **240**, 125-134.
- Birks, R.I. & Macintosh, F.C. (1957) Acetylcholine metabolism at nerve-endings. *Br Med Bull*, **13**, 157-161.
- Bisogno, T., Sepe, N., Melck, D., Maurelli, S., De Petrocellis, L. & Di Marzo, V. (1997) Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*, **322 (Pt 2)**, 671-677.
- Blankman, J.L., Simon, G.M. & Cravatt, B.F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, **14**, 1347-1356.
- Bloom, W.S., Schook, W. & Puszkin, S. (1981) Brain clathrin: ultrastructural and biophysical evidence of reversible assembly. *Mt Sinai J Med*, **48**, 404-411.
- Bonanomi, D., Fornasiero, E.F., Valdez, G., Halegoua, S., Benfenati, F., Menegon, A. & Valtorta, F. (2008) Identification of a developmentally regulated pathway of membrane retrieval in neuronal growth cones. *J Cell Sci*, **121**, 3757-3769.
- Bonifacino, J.S. & Glick, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, **116**, 153-166.
- Bos, J.L. (2003) Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 733-738.
- Bos, J.L. (2006) Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*, **31**, 680-686.
- Brailoiu, G.C., Oprea, T.I., Zhao, P., Abood, M.E. & Brailoiu, E. (2011) Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J Biol Chem*, **286**, 29166-29174.

- Branham, M.T., Bustos, M.A., De Blas, G.A., Rehmann, H., Zarelli, V.E., Trevino, C.L., Darszon, A., Mayorga, L.S. & Tomes, C.N. (2009) Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem*, **284**, 24825-24839.
- Brenowitz, S.D., Best, A.R. & Regehr, W.G. (2006) Sustained elevation of dendritic calcium evokes widespread endocannabinoid release and suppression of synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, **26**, 6841-6850.
- Brenowitz, S.D. & Regehr, W.G. (2003) Calcium dependence of retrograde inhibition by endocannabinoids at synapses onto Purkinje cells. *J Neurosci*, **23**, 6373-6384.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. & Sudhof, T.C. (1995) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem*, **270**, 25273-25280.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. & Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Brown, S.P., Brenowitz, S.D. & Regehr, W.G. (2003) Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat Neurosci*, **6**, 1048-1057.
- Brown, S.P., Safo, P.K. & Regehr, W.G. (2004) Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci*, **24**, 5623-5631.
- Bucurenciu, I., Kulik, A., Schwaller, B., Frotscher, M. & Jonas, P. (2008) Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and Ca²⁺ sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron*, **57**, 536-545.
- Buonomano, D.V. (2005) A learning rule for the emergence of stable dynamics and timing in recurrent networks. *J Neurophysiol*, **94**, 2275-2283.
- Burger, P.M., Mehl, E., Cameron, P.L., Maycox, P.R., Baumert, M., Lottspeich, F., De Camilli, P. & Jahn, R. (1989) Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron*, **3**, 715-720.
- Burns, D.L. (1988) Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin. *Microbiol Sci*, **5**, 285-287.
- Cao, H., Garcia, F. & McNiven, M.A. (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **9**, 2595-2609.
- Carey, M.R., Myoga, M.H., McDaniels, K.R., Marsicano, G., Lutz, B., Mackie, K. & Regehr, W.G. (2011) Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses. *J Neurophysiol*, **105**, 958-963.

- Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A.M., Appeltauer, U., Takei, K., Kindler, S., Veh, R.W., De Camilli, P., Gundelfinger, E.D. & Garner, C.C. (1996) Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol*, **69**, 214-223.
- Castillo, P.E., Janz, R., Sudhof, T.C., Tzounopoulos, T., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1997) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **388**, 590-593.
- Castillo, P.E., Younits, T.J., Chavez, A.E. & Hashimoto, Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, **76**, 70-81.
- Clayton, E.L., Anggono, V., Smillie, K.J., Chau, N., Robinson, P.J. & Cousin, M.A. (2009) The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, **29**, 7706-7717.
- Clayton, E.L. & Cousin, M.A. (2008) Differential labelling of bulk endocytosis in nerve terminals by FM dyes. *Neurochem Int*, **53**, 51-55.
- Clayton, E.L. & Cousin, M.A. (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem*, **111**, 901-914.
- Clayton, E.L., Evans, G.J. & Cousin, M.A. (2007) Activity-dependent control of bulk endocytosis by protein dephosphorylation in central nerve terminals. *J Physiol*, **585**, 687-691.
- Clayton, E.L., Evans, G.J. & Cousin, M.A. (2008) Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci*, **28**, 6627-6632.
- Clayton, E.L., Sue, N., Smillie, K.J., O'Leary, T., Bache, N., Cheung, G., Cole, A.R., Wyllie, D.J., Sutherland, C., Robinson, P.J. & Cousin, M.A. (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, **13**, 845-851.
- Coleman, W.L., Bill, C.A. & Bykhovskaia, M. (2007) Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. *Neuroscience*, **148**, 1-6.
- Condorelli, D.F., Dell'Albani, P., Aronica, E., Genazzani, A.A., Casabona, G., Corsaro, M., Balazs, R. & Nicoletti, F. (1993) Growth conditions differentially regulate the expression of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptor subunits in cultured neurons. *J Neurochem*, **61**, 2133-2139.
- Connors, B.W. & Long, M.A. (2004) Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 393-418.
- Corlew, R., Wang, Y., Ghermazien, H., Erisir, A. & Philpot, B.D. (2007) Developmental switch in the contribution of presynaptic and postsynaptic NMDA receptors to long-term depression. *J Neurosci*, **27**, 9835-9845.

- Cosker, K.E., Courchesne, S.L. & Segal, R.A. (2008) Action in the axon: generation and transport of signaling endosomes. *Curr Opin Neurobiol*, **18**, 270-275.
- Cousin, M.A. (2008) Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function. *Curr Protoc Neurosci*, **Chapter 2**, Unit 2 6.
- Cousin, M.A. & Evans, G.J. (2011) Activation of silent and weak synapses by cAMP-dependent protein kinase in cultured cerebellar granule neurons. *J Physiol*, **589**, 1943-1955.
- Cousin, M.A. & Robinson, P.J. (2001) The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci*, **24**, 659-665.
- Cowan, W.M., Südhof, T.C., Stevens, C.F. & Howard Hughes Medical Institute. (2001) *Synapses*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R. & Lichtman, A.H. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9371-9376.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A. & Gilula, N.B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **384**, 83-87.
- Crawford, D.C., Chang, C.Y., Hyrc, K.L. & Mennerick, S. (2011) Calcium-independent inhibitory G-protein signaling induces persistent presynaptic muting of hippocampal synapses. *J Neurosci*, **31**, 979-991.
- Crawford, D.C., Jiang, X., Taylor, A., Moulder, K.L. & Mennerick, S. (2012) Differential requirement for protein synthesis in presynaptic unmuting and muting in hippocampal glutamate terminals. *PLoS One*, **7**, e51930.
- Crawford, D.C. & Mennerick, S. (2012) Presynaptically silent synapses: dormancy and awakening of presynaptic vesicle release. *Neuroscientist*, **18**, 216-223.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., McCormick, D.A. & De Camilli, P. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, **99**, 179-188.
- Curtis, D.R., Phillis, J.W. & Watkins, J.C. (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol*, **150**, 656-682.
- Chad, J.E. & Eckert, R. (1984) Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses. *Biophys J*, **45**, 993-999.
- Chandrasekar, I., Huettner, J.E., Turney, S.G. & Bridgman, P.C. (2013) Myosin II Regulates Activity Dependent Compensatory Endocytosis at Central Synapses. *J Neurosci*, **33**, 16131-16145.

- Chang, C.Y., Jiang, X., Moulder, K.L. & Mennerick, S. (2010) Rapid activation of dormant presynaptic terminals by phorbol esters. *J Neurosci*, **30**, 10048-10060.
- Chang, M.P., Mallet, W.G., Mostov, K.E. & Brodsky, F.M. (1993) Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of alpha-adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J*, **12**, 2169-2180.
- Chapman, E.R. & Jahn, R. (1994) Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J Biol Chem*, **269**, 5735-5741.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L. & Dyda, F. (2010) G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*, **465**, 435-440.
- Chappie, J.S., Mears, J.A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S.L., Milligan, R.A., Hinshaw, J.E. & Dyda, F. (2011) A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*, **147**, 209-222.
- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J. & Manzoni, O. (1998) Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron*, **20**, 773-781.
- Chedotal, A. (2010) Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci*, **33**, 163-172.
- Chedotal, A. & Renaud, J. (2008) [Nucleus translocation in migrating neurons: key control by Sema6A and plexin A2]. *Med Sci (Paris)*, **24**, 797-798.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. & Vallee, R.B. (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*, **351**, 583-586.
- Cheung, G. & Cousin, M.A. (2012) Adaptor protein complexes 1 and 3 are essential for generation of synaptic vesicles from activity-dependent bulk endosomes. *J Neurosci*, **32**, 6014-6023.
- Cheung, G. & Cousin, M.A. (2013) Synaptic vesicle generation from activity-dependent bulk endosomes requires calcium and calcineurin. *J Neurosci*, **33**, 3370-3379.
- Chevalleyre, V. & Castillo, P.E. (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, **38**, 461-472.
- Chevalleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Sudhof, T.C. & Castillo, P.E. (2007) Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron*, **54**, 801-812.
- Chevalleyre, V., Takahashi, K.A. & Castillo, P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 37-76.

- Childers, S.R. & Deadwyler, S.A. (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **52**, 819-827.
- Chindewa, R., Lapanantasin, S., Sanvarinda, Y. & Chongthammakun, S. (2008) Pueraria mirifica, phytoestrogen-induced change in synaptophysin expression via estrogen receptor in rat hippocampal neuron. *J Med Assoc Thai*, **91**, 208-214.
- Chung, S.H., Kim, C.T., Jung, Y.H., Lee, N.S. & Jeong, Y.G. (2010) Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anat Cell Biol*, **43**, 86-95.
- Dang, P., Smythe, E. & Furley, A.J. (2012) TAG1 regulates the endocytic trafficking and signaling of the semaphorin3A receptor complex. *J Neurosci*, **32**, 10370-10382.
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C. & Zhuang, X. (2010) Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, **68**, 843-856.
- Daniel, H. & Crepel, F. (2001) Control of Ca²⁺ influx by cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in rat cerebellar cortex requires K⁺ channels. *J Physiol*, **537**, 793-800.
- Daniel, H., Rancillac, A. & Crepel, F. (2004) Mechanisms underlying cannabinoid inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx at parallel fibre synapses of the rat cerebellum. *J Physiol*, **557**, 159-174.
- Darcy, K.J., Staras, K., Collinson, L.M. & Goda, Y. (2006) Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci*, **9**, 315-321.
- David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O. & de Camilli, P. (1996) A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 331-335.
- Davletov, B.A. & Sudhof, T.C. (1993) A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J Biol Chem*, **268**, 26386-26390.
- De Camilli, P., Takei, K. & McPherson, P.S. (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, **5**, 559-565.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (2000) Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*, **275**, 20829-20836.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.
- Deak, F., Xu, Y., Chang, W.P., Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, X., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2009) Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *J Cell Biol*, **184**, 751-764.

- Dean, P., Porrill, J., Ekerot, C.F. & Jorntell, H. (2010) The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: experimental and computational evidence. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 30-43.
- Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Ohtsuka, T. & Takai, Y. (2004) CAST2: identification and characterization of a protein structurally related to the presynaptic cytomatrix protein CAST. *Genes Cells*, **9**, 15-23.
- den Boon, F.S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., Kruse, C.G., Maccarrone, M., Wadman, W.J. & Werkman, T.R. (2012) Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 3534-3539.
- Denker, A., Bethani, I., Krohnert, K., Korber, C., Horstmann, H., Wilhelm, B.G., Barysch, S.V., Kuner, T., Neher, E. & Rizzoli, S.O. (2011a) A small pool of vesicles maintains synaptic activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17177-17182.
- Denker, A., Krohnert, K., Buckers, J., Neher, E. & Rizzoli, S.O. (2011b) The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 17183-17188.
- DeSanty, K.P. & Dar, M.S. (2001) Cannabinoid-induced motor incoordination through the cerebellar CB(1) receptor in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **69**, 251-259.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946-1949.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C. & Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **372**, 686-691.
- Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, **443**, 651-657.
- Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M.R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B.J., Flavell, R., Picciotto, M.R., Ryan, T.A., Cremona, O. & De Camilli, P. (2002) Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron*, **33**, 789-804.
- Dickman, D.K., Horne, J.A., Meinertzhagen, I.A. & Schwarz, T.L. (2005) A slowed classical pathway rather than kiss-and-run mediates endocytosis at synapses lacking synaptojanin and endophilin. *Cell*, **123**, 521-533.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S. & Piomelli, D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10819-10824.

- Dinh, T.P., Kathuria, S. & Piomelli, D. (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol*, **66**, 1260-1264.
- Dittman, J. & Ryan, T.A. (2009) Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **25**, 133-160.
- Dittman, J.S., Kreitzer, A.C. & Regehr, W.G. (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci*, **20**, 1374-1385.
- Doherty, J.J., Alagarsamy, S., Bough, K.J., Conn, P.J., Dingledine, R. & Mott, D.D. (2004) Metabotropic glutamate receptors modulate feedback inhibition in a developmentally regulated manner in rat dentate gyrus. *J Physiol*, **561**, 395-401.
- Dreyer, F., Peper, K., Akert, K., Sandri, C. & Moor, H. (1973) Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction. *Brain Res*, **62**, 373-380.
- Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2697-2702.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*, **24**, 2839-2850.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*, **18**, 4372-4382.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J. & Rostas, J.A. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res*, **372**, 115-129.
- Edeling, M.A., Smith, C. & Owen, D. (2006) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 32-44.
- Efetova, M., Petereit, L., Rosiewicz, K., Overend, G., Haussig, F., Hovemann, B.T., Cabrero, P., JA, T.D. & Schwarzel, M. (2012) Separate roles of PKA and EPAC in renal function unraveled by the optogenetic control of cAMP levels in vivo. *J Cell Sci*.
- Egertova, M. & Elphick, M.R. (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol*, **422**, 159-171.
- Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S.P. & Jonas, P. (2012) Nanodomain coupling between Ca(2)(+) channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci*, **13**, 7-21.
- Espinosa, J.S. & Luo, L. (2008) Timing neurogenesis and differentiation: insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells. *J Neurosci*, **28**, 2301-2312.

- Evans, G.J. & Cousin, M.A. (2007) Activity-dependent control of slow synaptic vesicle endocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci*, **27**, 401-411.
- Evergren, E., Benfenati, F. & Shupliakov, O. (2007) The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res*, **85**, 2648-2656.
- Fasshauer, D., Eliason, W.K., Brunger, A.T. & Jahn, R. (1998a) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, **37**, 10354-10362.
- Fasshauer, D. & Margittai, M. (2004) A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem*, **279**, 7613-7621.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. & Jahn, R. (1998b) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15781-15786.
- Fatemi, S.H., Aldinger, K.A., Ashwood, P., Bauman, M.L., Blaha, C.D., Blatt, G.J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S.R., Dickson, P.E., Estes, A.M., Goldowitz, D., Heck, D.H., Kemper, T.L., King, B.H., Martin, L.A., Millen, K.J., Mittleman, G., Mosconi, M.W., Persico, A.M., Sweeney, J.A., Webb, S.J. & Welsh, J.P. (2012) Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum*, **11**, 777-807.
- Fei, H., Grygoruk, A., Brooks, E.S., Chen, A. & Krantz, D.E. (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic*, **9**, 1425-1436.
- Ferguson, S.M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wolfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L.W., Ariel, P., Paradise, S., O'Toole, E., Flavell, R., Cremona, O., Miesenbock, G., Ryan, T.A. & De Camilli, P. (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**, 570-574.
- Ferguson, S.M. & De Camilli, P. (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 75-88.
- Ferguson, S.M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., E, O.T. & De Camilli, P. (2009) Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, **17**, 811-822.
- Fernandez-Alfonso, T. & Ryan, T.A. (2008) A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. *Brain Cell Biol*, **36**, 87-100.
- Fernandez-Busnadiego, R., Zuber, B., Maurer, U.E., Cyrklaff, M., Baumeister, W. & Lucic, V. (2010) Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography. *J Cell Biol*, **188**, 145-156.

- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (1998) Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell*, **94**, 841-849.
- Ferrero, J.J., Alvarez, A.M., Ramirez-Franco, J., Godino, M.C., Bartolome-Martin, D., Aguado, C., Torres, M., Lujan, R., Ciruela, F. & Sanchez-Prieto, J. (2013) beta-adrenergic receptors activate Epac, translocate Munc13-1 and enhance the Rab3A-Rim1alpha interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J Biol Chem*.
- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F. & Meldolesi, J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol*, **4**, 1-4.
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G.A., Baumert, M., Perin, M.S., Hanson, T.J., Burger, P.M., Jahn, R. & Sudhof, T.C. (1990) rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1988-1992.
- Floor, E. & Feist, B.E. (1989) Most synaptic vesicles isolated from rat brain carry three membrane proteins, SV2, synaptophysin, and p65. *J Neurochem*, **52**, 1433-1437.
- Foldy, C., Malenka, R.C. & Sudhof, T.C. (2013) Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling. *Neuron*, **78**, 498-509.
- Ford, M.G., Jenni, S. & Nunnari, J. (2011) The crystal structure of dynamin. *Nature*, **477**, 561-566.
- Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. & McMahon, H.T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, **419**, 361-366.
- Freneau, R.T., Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R.J., Chaudhry, F.A. & Edwards, R.H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14488-14493.
- Freund, T.F., Katona, I. & Piomelli, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*, **83**, 1017-1066.
- Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T. & Seino, S. (2002) Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J Biol Chem*, **277**, 50497-50502.
- Fujita, M. (1982) Adaptive filter model of the cerebellum. *Biol Cybern*, **45**, 195-206.
- Fukaya, M., Uchigashima, M., Nomura, S., Hasegawa, Y., Kikuchi, H. & Watanabe, M. (2008) Predominant expression of phospholipase Cbeta1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur J Neurosci*, **28**, 1744-1759.

- Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. & Mikoshiba, K. (1994) Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. *J Biol Chem*, **269**, 29206-29211.
- Fukuda, M., Kojima, T. & Mikoshiba, K. (1996) Phospholipid composition dependence of Ca^{2+} -dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *J Biol Chem*, **271**, 8430-8434.
- Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T. & Kano, M. (2004) Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur J Neurosci*, **19**, 2682-2692.
- Galante, M. & Diana, M.A. (2004) Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production. *J Neurosci*, **24**, 4865-4874.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. & Jorgensen, O.S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**, 2203-2213.
- Gandhi, S.P. & Stevens, C.F. (2003) Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature*, **423**, 607-613.
- Gao, Y., Vasilyev, D.V., Goncalves, M.B., Howell, F.V., Hobbs, C., Reisenberg, M., Shen, R., Zhang, M.Y., Strassle, B.W., Lu, P., Mark, L., Piesla, M.J., Deng, K., Kouranova, E.V., Ring, R.H., Whiteside, G.T., Bates, B., Walsh, F.S., Williams, G., Pangalos, M.N., Samad, T.A. & Doherty, P. (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, **30**, 2017-2024.
- Gaspar, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M. & Wittinghofer, A. (2009) It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 423-429.
- Gekel, I. & Neher, E. (2008) Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses. *J Neurosci*, **28**, 7991-8002.
- Gerard, C., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 7142.
- Gerdeman, G.L., Ronesi, J. & Lovinger, D.M. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, **5**, 446-451.
- Godino, M.C., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2005) Inhibition of N- and P/Q-type Ca^{2+} channels by cannabinoid receptors in single cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett*, **579**, 768-772.
- Gracheva, E.O., Hadwiger, G., Nonet, M.L. & Richmond, J.E. (2008) Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density. *Neurosci Lett*, **444**, 137-142.

- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J. & Lagnado, L. (2007) Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J Physiol*, **585**, 681-686.
- Groth, R.D., Dunbar, R.L. & Mermelstein, P.G. (2003) Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 1159-1171.
- Grueter, B.A., Brasnjo, G. & Malenka, R.C. (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, **13**, 1519-1525.
- Guan, R., Dai, H., Harrison, S.C. & Kirchhausen, T. (2010) Structure of the PTEN-like region of auxilin, a detector of clathrin-coated vesicle budding. *Structure*, **18**, 1191-1198.
- Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boschia, F. & Freund, T.F. (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, **20**, 441-458.
- Gundelfinger, E.D. & Fejtova, A. (2012) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 423-430.
- Guo, J. & Ikeda, S.R. (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol*, **65**, 665-674.
- Han, Y., Kaeser, P.S., Sudhof, T.C. & Schneggenburger, R. (2011) RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron*, **69**, 304-316.
- Harata, N., Ryan, T.A., Smith, S.J., Buchanan, J. & Tsien, R.W. (2001) Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12748-12753.
- Harata, N.C., Choi, S., Pyle, J.L., Aravanis, A.M. & Tsien, R.W. (2006) Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron*, **49**, 243-256.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y. & Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, **5**, 405-414.
- Hashimoto, M. & Hibi, M. (2012) Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*, **54**, 373-389.
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. (2007) Ca²⁺-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 360-365.

- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H.S. & Kano, M. (2005) Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron*, **45**, 257-268.
- Hata, Y., Slaughter, C.A. & Sudhof, T.C. (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, **366**, 347-351.
- Haucke, V. & De Camilli, P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science*, **285**, 1268-1271.
- Hayashi, M., Raimondi, A., O'Toole, E., Paradise, S., Collesi, C., Cremona, O., Ferguson, S.M. & De Camilli, P. (2008) Cell- and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2175-2180.
- He, L. & Wu, L.G. (2007) The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci*, **30**, 447-455.
- He, L., Wu, X.S., Mohan, R. & Wu, L.G. (2006) Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature*, **444**, 102-105.
- Heifets, B.D. & Castillo, P.E. (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, **71**, 283-306.
- Heifets, B.D., Chevaleyre, V. & Castillo, P.E. (2008) Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10250-10255.
- Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, **373**, 663-664.
- Henneberger, C., Redman, S.J. & Grantyn, R. (2007) Cortical efferent control of subcortical sensory neurons by synaptic disinhibition. *Cereb Cortex*, **17**, 2039-2049.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, **11**, 563-583.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. & Rice, K.C. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1932-1936.
- Heuser, J. (1989) The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane. *Cell Biol Int Rep*, **13**, 1063-1076.
- Heuser, J.E. & Reese, T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **57**, 315-344.

- Hibi, M. & Shimizu, T. (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol*, **72**, 282-301.
- Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaya, M., Hudspeth, A.J. & Lesage, F. (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron*, **34**, 411-423.
- Hida, Y. & Ohtsuka, T. (2010) CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *J Biochem*, **148**, 131-137.
- Hinshaw, J.E. & Schmid, S.L. (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, **374**, 190-192.
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rozsa, B., Kulik, A., Watanabe, M. & Nusser, Z. (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci*, **15**, 988-997.
- Holtzman, E., Freeman, A.R. & Kashner, L.A. (1971) Stimulation-dependent alterations in peroxidase uptake at lobster neuromuscular junctions. *Science*, **173**, 733-736.
- Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.
- Honore, T., Lauridsen, J. & Krogsgaard-Larsen, P. (1982) The binding of [3H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid, to rat brain membranes. *J Neurochem*, **38**, 173-178.
- Hosoi, N., Holt, M. & Sakaba, T. (2009) Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. *Neuron*, **63**, 216-229.
- Howlett, A.C., Quail, J.M. & Khachatrian, L.L. (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, **29**, 307-313.
- Hua, Z., Leal-Ortiz, S., Foss, S.M., Waites, C.L., Garner, C.C., Voglmaier, S.M. & Edwards, R.H. (2011) v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*, **71**, 474-487.
- Huang, C.C., Lo, S.W. & Hsu, K.S. (2001) Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol*, **532**, 731-748.
- Huang, Y., Yasuda, H., Sarihi, A. & Tsumoto, T. (2008) Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice. *J Neurosci*, **28**, 7074-7083.
- Huang, Y.Y., Zakharenko, S.S., Schoch, S., Kaeser, P.S., Janz, R., Sudhof, T.C., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R. (2005) Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9365-9370.

- Hurtado, O., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Moraga, A., Pradillo, J.M., Ramirez-Franco, J., Bartolome-Martin, D., Pascual, D., Torres, M., Sanchez-Prieto, J., Salom, J.B., Lizasoain, I. & Moro, M.A. (2012) Daidzein has neuroprotective effects through ligand-binding-independent PPARgamma activation. *Neurochem Int*, **61**, 119-127.
- Incontro, S., Ramirez-Franco, J., Sanchez-Prieto, J. & Torres, M. (2011) Membrane depolarization regulates AMPA receptor subunit expression in cerebellar granule cells in culture. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 14-26.
- Ishizuka, T., Saisu, H., Suzuki, T., Kirino, Y. & Abe, T. (1997) Molecular cloning of synaphins/complexins, cytosolic proteins involved in transmitter release, in the electric organ of an electric ray (*Narke japonica*). *Neurosci Lett*, **232**, 107-110.
- Isope, P. & Barbour, B. (2002) Properties of unitary granule cell-->Purkinje cell synapses in adult rat cerebellar slices. *J Neurosci*, **22**, 9668-9678.
- Ito, M. (1984) *The cerebellum and neural control*. Raven Press, New York.
- Ito, M. (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci*, **12**, 85-102.
- Ito, M. (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev*, **81**, 1143-1195.
- Ito, M. (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 896-902.
- Ito, M. (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, **78**, 272-303.
- Ito, M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 304-313.
- Itoh, T. & De Camilli, P. (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 897-912.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H. & De Camilli, P. (2005) Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell*, **9**, 791-804.
- Ivannikov, M.V., Harris, K.M. & Macleod, G.T. (2010) Mitochondria: enigmatic stewards of the synaptic vesicle reserve pool. *Front Synaptic Neurosci*, **2**, 145.
- Jabonero, V. (1967) [The significance of the varicosities of postganglionic nerve fibers and the light optic identification of the active zone in the region of the neuroeffector synapse]. *Acta Neuroveg (Wien)*, **30**, 372-382.

- Jacobson, S. & Marcus, E.M. (2008) *Neuroanatomy for the neuroscientist*. Springer, New York, NY.
- Jahn, R. & Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.
- Jahn, R. & Grubmüller, H. (2002) Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 488-495.
- Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 631-643.
- Jahr, C.E. (1992) High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science*, **255**, 470-472.
- Jose, M., Nair, D.K., Altrock, W.D., Dresbach, T., Gundelfinger, E.D. & Zuschratter, W. (2008) Investigating interactions mediated by the presynaptic protein bassoon in living cells by Foerster's resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biophys J*, **94**, 1483-1496.
- Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., Uneyama, H., Edwards, R.H., Nicoll, R.A. & Moriyama, Y. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*, **68**, 99-112.
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H. & Moriyama, Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem*, **281**, 39499-39506.
- Junge, H.J., Rhee, J.S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M.N., Rosenmund, C. & Brose, N. (2004) Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell*, **118**, 389-401.
- Jurado, S., Sanchez-Prieto, J. & Torres, M. (2003) Differential expression of NO-sensitive guanylyl cyclase subunits during the development of rat cerebellar granule cells: regulation via N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cell Sci*, **116**, 3165-3175.
- Juranek, J.K., Mukherjee, K., Siddiqui, T.J., Kaplan, B.J., Li, J.Y., Ahnert-Hilger, G., Jahn, R. & Calka, J. (2013) Active zone protein expression changes at the key stages of cerebellar cortex neurogenesis in the rat. *Acta Histochem*, **115**, 616-625.
- Kaesler, P.S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. & Sudhof, T.C. (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, **144**, 282-295.
- Kaesler, P.S., Kwon, H.B., Chiu, C.Q., Deng, L., Castillo, P.E. & Sudhof, T.C. (2008) RIM1α and RIM1β are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions. *J Neurosci*, **28**, 13435-13447.

- Kaesler, P.S. & Sudhof, T.C. (2005) RIM function in short- and long-term synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1345-1349.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2000) *Principles of neural science*. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.
- Kaneko, M. & Takahashi, T. (2004) Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J Neurosci*, **24**, 5202-5208.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, **89**, 309-380.
- Karlsson, M., Contreras, J.A., Hellman, U., Tornqvist, H. & Holm, C. (1997) cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem*, **272**, 27218-27223.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H. & Seino, S. (2001) Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem*, **276**, 46046-46053.
- Katona, I., Urban, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.M., Piomelli, D., Mackie, K. & Freund, T.F. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, **26**, 5628-5637.
- Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T. & Kano, M. (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, **26**, 2991-3001.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. & Graybiel, A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, **282**, 2275-2279.
- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. & Glass, M. (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, **67**, 1697-1704.
- Khvotchev, M., Dulubova, I., Sun, J., Dai, H., Rizo, J. & Sudhof, T.C. (2007) Dual modes of Munc18-1/SNARE interactions are coupled by functionally critical binding to syntaxin-1 N terminus. *J Neurosci*, **27**, 12147-12155.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C. & Alger, B.E. (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci*, **22**, 10182-10191.
- Kim, J.H. & von Gersdorff, H. (2009) Traffic jams during vesicle cycling lead to synaptic depression. *Neuron*, **63**, 143-145.

- Kim, S.H. & Ryan, T.A. (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron*, **67**, 797-809.
- Kinoshita, A., Ohishi, H., Neki, A., Nomura, S., Shigemoto, R., Takada, M., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1996) Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett*, **207**, 61-64.
- Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 699-727.
- Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K.P. & Mori, Y. (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci*, **10**, 691-701.
- Klingauf, J., Kavalali, E.T. & Tsien, R.W. (1998) Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*, **394**, 581-585.
- Ko, J., Na, M., Kim, S., Lee, J.R. & Kim, E. (2003) Interaction of the ERC family of RIM-binding proteins with the liprin-alpha family of multidomain proteins. *J Biol Chem*, **278**, 42377-42385.
- Koenig, J.H. & Ikeda, K. (1989) Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci*, **9**, 3844-3860.
- Koester, H.J. & Johnston, D. (2005) Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses. *Science*, **308**, 863-866.
- Kohara, K., Ogura, A., Akagawa, K. & Yamaguchi, K. (2001) Increase in number of functional release sites by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured neurons isolated from hippocampal dentate gyrus. *Neurosci Res*, **41**, 79-88.
- Kokubo, M., Nishio, M., Ribar, T.J., Anderson, K.A., West, A.E. & Means, A.R. (2009) BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. *J Neurosci*, **29**, 8901-8913.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*, **257**, 806-809.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1998) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol*, **37**, 110-130.
- Komuro, H., Yacubova, E. & Rakic, P. (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci*, **21**, 527-540.

- Kononenko, N.L., Diril, M.K., Puchkov, D., Kintscher, M., Koo, S.J., Pfuhl, G., Winter, Y., Wienisch, M., Klingauf, J., Breustedt, J., Schmitz, D., Maritzen, T. & Haucke, V. (2013) Compromised fidelity of endocytic synaptic vesicle protein sorting in the absence of stonin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E526-535.
- Koo, S.J., Markovic, S., Puchkov, D., Mahrenholz, C.C., Beceren-Braun, F., Maritzen, T., Darnedde, J., Volkmer, R., Oschkinat, H. & Haucke, V. (2011) SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 13540-13545.
- Kotaleski, J.H. & Blackwell, K.T. (2010) Modelling the molecular mechanisms of synaptic plasticity using systems biology approaches. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 239-251.
- Kozlovsky, Y. & Kozlov, M.M. (2002) Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophys J*, **82**, 882-895.
- Krauss, M., Kukhtina, V., Pechstein, A. & Haucke, V. (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11934-11939.
- Kreitzer, A.C. & Regehr, W.G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, **29**, 717-727.
- Krueger, D.D. & Brose, N. (2013) Evidence for a common endocannabinoid-related pathomechanism in autism spectrum disorders. *Neuron*, **78**, 408-410.
- Kullmann, D.M., Erdemli, G. & Asztely, F. (1996) LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron*, **17**, 461-474.
- Kumashiro, S., Lu, Y.F., Tomizawa, K., Matsushita, M., Wei, F.Y. & Matsui, H. (2005) Regulation of synaptic vesicle recycling by calcineurin in different vesicle pools. *Neurosci Res*, **51**, 435-443.
- Kummel, D., Krishnakumar, S.S., Radoff, D.T., Li, F., Giraudo, C.G., Pincet, F., Rothman, J.E. & Reinisch, K.M. (2011) Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 927-933.
- Kuromi, H. & Kidokoro, Y. (2000) Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron*, **27**, 133-143.
- Kushmerick, C., Price, G.D., Taschenberger, H., Puente, N., Renden, R., Wadiche, J.I., Duvoisin, R.M., Grandes, P. & von Gersdorff, H. (2004) Retroinhibition of presynaptic Ca²⁺ currents by endocannabinoids released via postsynaptic mGluR activation at a calyx synapse. *J Neurosci*, **24**, 5955-5965.
- Landis, D.M., Hall, A.K., Weinstein, L.A. & Reese, T.S. (1988) The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron*, **1**, 201-209.

- Lazarevic, V., Schone, C., Heine, M., Gundelfinger, E.D. & Fejtova, A. (2011) Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing. *J Neurosci*, **31**, 10189-10200.
- Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S. & Lemmon, M.A. (1999) Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol*, **9**, 261-264.
- Leenders, A.G., Lopes da Silva, F.H., Ghijsen, W.E. & Verhage, M. (2001) Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell*, **12**, 3095-3102.
- Leiner, H.C., Leiner, A.L. & Dow, R.S. (1986) Does the cerebellum contribute to mental skills? *Behav Neurosci*, **100**, 443-454.
- Leiner, H.C., Leiner, A.L. & Dow, R.S. (1993) Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends Neurosci*, **16**, 444-447.
- Lenz, R.A., Wagner, J.J. & Alger, B.E. (1998) N- and L-type calcium channel involvement in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *J Physiol*, **512** (Pt 1), 61-73.
- Lerma, J. (1997) Kainate reveals its targets. *Neuron*, **19**, 1155-1158.
- Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M. & Cravatt, B.F. (2006) Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*, **45**, 4720-4726.
- Levenes, C., Daniel, H., Soubrie, P. & Crepel, F. (1998) Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*, **510** (Pt 3), 867-879.
- Lewis, M.J., Rayner, J.C. & Pelham, H.R. (1997) A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **16**, 3017-3024.
- Lichte, B., Veh, R.W., Meyer, H.E. & Kilimann, M.W. (1992) Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J*, **11**, 2521-2530.
- Limbach, C., Laue, M.M., Wang, X., Hu, B., Thiede, N., Hultqvist, G. & Kilimann, M.W. (2011) Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, E392-401.
- Link, E., Edelmann, L., Chou, J.H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Sudhof, T.C., Niemann, H. & Jahn, R. (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 1017-1023.

- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, **66**, 807-815.
- Liu, K.S., Siebert, M., Mertel, S., Knoche, E., Wegener, S., Wichmann, C., Matkovic, T., Muhammad, K., Depner, H., Mettke, C., Buckers, J., Hell, S.W., Muller, M., Davis, G.W., Schmitz, D. & Sigrist, S.J. (2011) RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science*, **334**, 1565-1569.
- Lochner, A. & Moolman, J.A. (2006) The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev*, **24**, 261-274.
- Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C.J., Sudhof, T.C. & Linden, D.J. (2003) Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*, **115**, 49-60.
- Lopez-Jimenez, M.E., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J. & Torres, M. (2009) Suppression of guanylyl cyclase (beta1 subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells. *Cell Death Differ*, **16**, 1266-1278.
- Lou, X., Scheuss, V. & Schneggenburger, R. (2005) Allosteric modulation of the presynaptic Ca²⁺ sensor for vesicle fusion. *Nature*, **435**, 497-501.
- Lu, J., Machius, M., Dulubova, I., Dai, H., Sudhof, T.C., Tomchick, D.R. & Rizo, J. (2006) Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch. *PLoS Biol*, **4**, e192.
- Llano, I., Leresche, N. & Marty, A. (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, **6**, 565-574.
- Llinas, R., Sugimori, M. & Silver, R.B. (1995) The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology*, **34**, 1443-1451.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. & Kirchhausen, T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, **10**, 839-850.
- Mackie, K. (2005) Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci*, **77**, 1667-1673.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. & Mitchell, R. (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, **15**, 6552-6561.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. & Kano, M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, **31**, 463-475.
- Maejima, T., Oka, S., Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T. & Kano, M. (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase Cbeta4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*, **25**, 6826-6835.

- Maggio, R., Vogel, Z. & Wess, J. (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3103-3107.
- Makriyannis, A., Tian, X. & Guo, J. (2005) How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **77**, 210-218.
- Marks, B. & McMahon, H.T. (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol*, **8**, 740-749.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V. & Lutz, B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, **418**, 530-534.
- Martin, R., Bartolome-Martin, D., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2011) Non-additive potentiation of glutamate release by phorbol esters and metabotropic mGlu7 receptor in cerebrocortical nerve terminals. *J Neurochem*, **116**, 476-485.
- Martina, J.A., Bonangelino, C.J., Aguilar, R.C. & Bonifacino, J.S. (2001) Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J Cell Biol*, **153**, 1111-1120.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, **349**, 760-765.
- Mato, S., Lafourcade, M., Robbe, D., Bakiri, Y. & Manzoni, O.J. (2008) Role of the cyclic-AMP/PKA cascade and of P/Q-type Ca⁺⁺ channels in endocannabinoid-mediated long-term depression in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, **54**, 87-94.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. & Bonner, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561-564.
- Maycox, P.R., Link, E., Reetz, A., Morris, S.A. & Jahn, R. (1992) Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, **118**, 1379-1388.
- McMahon, H.T., Kozlov, M.M. & Martens, S. (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell*, **140**, 601-605.
- McMahon, H.T., Missler, M., Li, C. & Sudhof, T.C. (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, **83**, 111-119.
- McPherson, P.S., Garcia, E.P., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y. & De Camilli, P. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379**, 353-357.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R. & et al. (1995) Identification of an endogenous 2-

- monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **50**, 83-90.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H. & Unser, M. (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*, **58**, 167-176.
- Merrifield, C.J., Feldman, M.E., Wan, L. & Almers, W. (2002) Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*, **4**, 691-698.
- Micheva, K.D., Holz, R.W. & Smith, S.J. (2001) Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol*, **154**, 355-368.
- Micheva, K.D., Kay, B.K. & McPherson, P.S. (1997a) Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem*, **272**, 27239-27245.
- Micheva, K.D., Ramjaun, A.R., Kay, B.K. & McPherson, P.S. (1997b) SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett*, **414**, 308-312.
- Miesenbock, G., De Angelis, D.A. & Rothman, J.E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, **394**, 192-195.
- Miller, S.E., Sahlender, D.A., Graham, S.C., Honing, S., Robinson, M.S., Peden, A.A. & Owen, D.J. (2011) The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. *Cell*, **147**, 1118-1131.
- Miller, T.M. & Heuser, J.E. (1984) Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **98**, 685-698.
- Mitra, A., Mitra, S.S. & Tsien, R.W. (2012) Heterogeneous reallocation of presynaptic efficacy in recurrent excitatory circuits adapting to inactivity. *Nat Neurosci*, **15**, 250-257.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, **256**, 1217-1221.
- Morris, S.A., Mann, A. & Ungewickell, E. (1990) Analysis of 100-180-kDa phosphoproteins in clathrin-coated vesicles from bovine brain. *J Biol Chem*, **265**, 3354-3357.
- Moulder, K.L., Jiang, X., Chang, C., Taylor, A.A., Benz, A.M., Conti, A.C., Muglia, L.J. & Mennerick, S. (2008) A specific role for Ca²⁺-dependent adenylyl cyclases in recovery from adaptive presynaptic silencing. *J Neurosci*, **28**, 5159-5168.
- Moulder, K.L., Jiang, X., Taylor, A.A., Olney, J.W. & Mennerick, S. (2006) Physiological activity depresses synaptic function through an effect on vesicle priming. *J Neurosci*, **26**, 6618-6626.

- Moulder, K.L., Meeks, J.P., Shute, A.A., Hamilton, C.K., de Erausquin, G. & Mennerick, S. (2004) Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization. *Neuron*, **42**, 423-435.
- Mozhayeva, M.G., Sara, Y., Liu, X. & Kavalali, E.T. (2002) Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci*, **22**, 654-665.
- Mundy, W.R., Robinette, B., Radio, N.M. & Freudenrich, T.M. (2008) Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development. *Toxicology*, **249**, 220-229.
- Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61-65.
- Neher, E. (1998) Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca⁺⁺ signals. *Cell Calcium*, **24**, 345-357.
- Neves, G. & Lagnado, L. (1999) The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol*, **515 (Pt 1)**, 181-202.
- Nevian, T. & Sakmann, B. (2006) Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci*, **26**, 11001-11013.
- Newton, A.J., Kirchhausen, T. & Murthy, V.N. (2006) Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17955-17960.
- Ng, M., Roorda, R.D., Lima, S.Q., Zemelman, B.V., Morcillo, P. & Miesenbock, G. (2002) Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron*, **36**, 463-474.
- Nicoletti, F., Battaglia, G., Storto, M., Ngomba, R.T., Iacovelli, L., Arcella, A., Gradini, R., Sale, P., Rampello, L., De Vita, T., Di Marco, R., Melchiorri, D. & Bruno, V. (2007) Metabotropic glutamate receptors: beyond the regulation of synaptic transmission. *Psychoneuroendocrinology*, **32 Suppl 1**, S40-45.
- Nicoletti, F., Meek, J.L., Iadarola, M.J., Chuang, D.M., Roth, B.L. & Costa, E. (1986) Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J Neurochem*, **46**, 40-46.
- Nyiri, G., Cserep, C., Szabadits, E., Mackie, K. & Freund, T.F. (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, **136**, 811-822.
- Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. (1990) Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature*, **347**, 256-261.

- Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Suzuki, T., Asano, T., Uematsu, T., Goto, T., Hori, S., Kenmochi, T., Nakagoori, T. & et al. (1987) Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc*, **19**, 1284-1286.
- Oh, E., Kalwat, M.A., Kim, M.J., Verhage, M. & Thurmond, D.C. (2012) Munc18-1 regulates first-phase insulin release by promoting granule docking to multiple syntaxin isoforms. *J Biol Chem*, **287**, 25821-25833.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. & Kano, M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, **29**, 729-738.
- Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H. & Kano, M. (2002) Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur J Neurosci*, **15**, 953-961.
- Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K., Deguchi-Tawarada, M., Satoh, K., Morimoto, K., Nakanishi, H. & Takai, Y. (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol*, **158**, 577-590.
- Okamoto, P.M., Herskovits, J.S. & Vallee, R.B. (1997) Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem*, **272**, 11629-11635.
- Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J. & Ueda, N. (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers*, **4**, 1842-1857.
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. & Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, **50**, 5558-5565.
- Orenbuch, A., Shalev, L., Marra, V., Sinai, I., Lavy, Y., Kahn, J., Burden, J.J., Staras, K. & Gitler, D. (2012) Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals. *J Neurosci*, **32**, 3969-3980.
- Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (2000) *Glutamate*. Elsevier, Amsterdam.
- Owen, D.J. (2004) Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem Soc Trans*, **32**, 1-14.
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E. & Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol*, **109**, 3039-3052.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y. & Seino, S. (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*, **2**, 805-811.

- Paillart, C., Li, J., Matthews, G. & Sterling, P. (2003) Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse. *J Neurosci*, **23**, 4092-4099.
- Palay, S.L. (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*, **2**, 193-202.
- Palkovits, M., Magyar, P. & Szentagothai, J. (1971) Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer. *Brain Res*, **32**, 15-30.
- Pan, B., Hillard, C.J. & Liu, Q.S. (2008) Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, **28**, 1385-1397.
- Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C.M. & Grant, B.D. (2009) AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol*, **11**, 1399-1410.
- Park, H., Li, Y. & Tsien, R.W. (2012) Influence of synaptic vesicle position on release probability and exocytotic fusion mode. *Science*, **335**, 1362-1366.
- Park, R., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S.M. & De Camilli, P. (2013) Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J Cell Sci*.
- Patel, S. & Hillard, C.J. (2001) Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 629-637.
- Pearse, B.M. (1976) Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1255-1259.
- Pelkey, K.A., Topolnik, L., Lacaille, J.C. & McBain, C.J. (2006) Compartmentalized Ca(2+) channel regulation at divergent mossy-fiber release sites underlies target cell-dependent plasticity. *Neuron*, **52**, 497-510.
- Perez Bay, A.E., Ibanez, L.I. & Marengo, F.D. (2007) Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1509-1522.
- Perin, M.S., Brose, N., Jahn, R. & Sudhof, T.C. (1991a) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem*, **266**, 623-629.
- Perin, M.S., Johnston, P.A., Ozcelik, T., Jahn, R., Francke, U. & Sudhof, T.C. (1991b) Structural and functional conservation of synaptotagmin (p65) in *Drosophila* and humans. *J Biol Chem*, **266**, 615-622.
- Perkins, G.A., Tjong, J., Brown, J.M., Poquiz, P.H., Scott, R.T., Kolson, D.R., Ellisman, M.H. & Spirou, G.A. (2010) The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci*, **30**, 1015-1026.

- Pertwee, R.G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, **74**, 129-180.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. & McMahon, H.T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**, 495-499.
- Pfenninger, K., Akert, K., Moor, H. & Sandri, C. (1972) The fine structure of freeze-fractured presynaptic membranes. *J Neurocytol*, **1**, 129-149.
- Pitler, T.A. & Alger, B.E. (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, **12**, 4122-4132.
- Pitler, T.A. & Alger, B.E. (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron*, **13**, 1447-1455.
- Poirier, M.A., Xiao, W., Macosko, J.C., Chan, C., Shin, Y.K. & Bennett, M.K. (1998) The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol*, **5**, 765-769.
- Porrill, J. & Dean, P. (2008) Silent synapses, LTP, and the indirect parallel-fibre pathway: computational consequences of optimal cerebellar noise-processing. *PLoS Comput Biol*, **4**, e1000085.
- Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P. & Manzoni, O.J. (2011) Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci*, **14**, 1542-1547.
- Puente, N., Elezgarai, I., Lafourcade, M., Reguero, L., Marsicano, G., Georges, F., Manzoni, O.J. & Grandes, P. (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One*, **5**, e8869.
- Qiu, D.L. & Knopfel, T. (2009) Presynaptically expressed long-term depression at cerebellar parallel fiber synapses. *Pflugers Arch*, **457**, 865-875.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P.J. & Kelly, R.B. (1999) Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell*, **10**, 501-513.
- Quan, A., McGeachie, A.B., Keating, D.J., van Dam, E.M., Rusak, J., Chau, N., Malladi, C.S., Chen, C., McCluskey, A., Cousin, M.A. & Robinson, P.J. (2007) Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamin inhibitors that block endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II. *Mol Pharmacol*, **72**, 1425-1439.
- Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R. & Fasshauer, D. (2009) The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*, **284**, 25749-25760.

- Raimondi, A., Ferguson, S.M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., O'Toole, E., Ryan, T.A. & De Camilli, P. (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, **70**, 1100-1114.
- Ramirez-Franco, J., Alonso, B., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J. & Torres, M. (2013) Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling. *BMC Neurosci*, **14**, 127.
- Ramirez, D.M. & Kavalali, E.T. (2012) The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cell Logist*, **2**, 20-27.
- Ramjaun, A.R. & McPherson, P.S. (1996) Tissue-specific alternative splicing generates two synaptobrevin isoforms with differential membrane binding properties. *J Biol Chem*, **271**, 24856-24861.
- Ramón y Cajal, S. (1899) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados : estudios sobre el plan estructural y composicion histologica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiologicas fundadas en los nuevos descubrimientos*. N. Moya, Madrid.
- Rao, Y., Ruckert, C., Saenger, W. & Haucke, V. (2012) The early steps of endocytosis: from cargo selection to membrane deformation. *Eur J Cell Biol*, **91**, 226-233.
- Rathore, S.S., Bend, E.G., Yu, H., Hammarlund, M., Jorgensen, E.M. & Shen, J. (2010) Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 22399-22406.
- Ratnayaka, A., Marra, V., Branco, T. & Staras, K. (2011) Extrasynaptic vesicle recycling in mature hippocampal neurons. *Nat Commun*, **2**, 531.
- Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S.O., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (2003) Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*, **278**, 38548-38556.
- Renaud, J., Kerjan, G., Sumita, I., Zagar, Y., Georget, V., Kim, D., Fouquet, C., Suda, K., Sanbo, M., Suto, F., Ackerman, S.L., Mitchell, K.J., Fujisawa, H. & Chedotal, A. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nat Neurosci*, **11**, 440-449.
- Renstrom, E., Eliasson, L. & Rorsman, P. (1997) Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, **502 (Pt 1)**, 105-118.
- Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C. & Brose, N. (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell*, **108**, 121-133.
- Richards, D.A., Guatimosim, C. & Betz, W.J. (2000) Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*, **27**, 551-559.

- Richards, D.A., Guatimosim, C., Rizzoli, S.O. & Betz, W.J. (2003) Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron*, **39**, 529-541.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P. (2001) Differential expression of endophilin 1 and 2 dimers at central nervous system synapses. *J Biol Chem*, **276**, 40424-40430.
- Rizzoli, S.O., Bethani, I., Zwilling, D., Wenzel, D., Siddiqui, T.J., Brandhorst, D. & Jahn, R. (2006) Evidence for early endosome-like fusion of recently endocytosed synaptic vesicles. *Traffic*, **7**, 1163-1176.
- Rizzoli, S.O. & Betz, W.J. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 57-69.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J. & Manzoni, O.J. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8384-8388.
- Robitaille, R., Adler, E.M. & Charlton, M.P. (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron*, **5**, 773-779.
- Rodriguez-Moreno, A. & Lerma, J. (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*, **20**, 1211-1218.
- Rodriguez-Moreno, A. & Paulsen, O. (2008) Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci*, **11**, 744-745.
- Ronesi, J., Gerdeman, G.L. & Lovinger, D.M. (2004) Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci*, **24**, 1673-1679.
- Rose, T., Schoenenberger, P., Jezek, K. y Oertner, T.G. (2013) Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses. *Neuron*, **77**, 1109-1121.
- Rosenmund, C. & Stevens, C.F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207.
- Roser, P., Gallinat, J., Weinberg, G., Juckel, G., Gorynia, I. & Stadelmann, A.M. (2009) Psychomotor performance in relation to acute oral administration of Delta9-tetrahydrocannabinol and standardized cannabis extract in healthy human subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **259**, 284-292.
- Rothman, J.S., Cathala, L., Steuber, V. & Silver, R.A. (2009) Synaptic depression enables neuronal gain control. *Nature*, **457**, 1015-1018.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P.A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., Lambrechts, D., Van Geyte, K., Dhondt, J., Dresselaers, T., Renaud, J., Aragones, J., Zacchigna, S., Geudens, I., Gall, D., Stroobants, S., Mutin, M., Dassonville, K., Storkebaum, E., Jordan, B.F., Eriksson, U., Moons, L., D'Hooze, R., Haigh, J.J., Belin, M.F., Schiffmann, S., Van Hecke, P.,

- Gallez, B., Vinckier, S., Chedotal, A., Honnorat, J., Thomasset, N., Carmeliet, P. & Meissirel, C. (2010) Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci*, **30**, 15052-15066.
- Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., Washida, M., Katoh-Semba, R., Shutoh, F., Okamoto, T., Nakashima, H., Kimura, K., Tanaka, M., Sekine, Y., Itohara, S., Yuzaki, M., Nagao, S. & Furuichi, T. (2007) Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci*, **27**, 2472-2482.
- Safo, P.K., Cravatt, B.F. & Regehr, W.G. (2006) Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex. *Cerebellum*, **5**, 134-145.
- Safo, P.K. & Regehr, W.G. (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron*, **48**, 647-659.
- Saheki, Y. & De Camilli, P. (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a005645.
- Sakaba, T. & Neher, E. (2003) Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature*, **424**, 775-778.
- Sankaranarayanan, S. & Ryan, T.A. (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol*, **2**, 197-204.
- Sankaranarayanan, S. & Ryan, T.A. (2001) Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, **4**, 129-136.
- Sayan-Ozacmak, H., Ozacmak, V.H., Barut, F. & Jakubowska-Dogru, E. (2011) Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand in chronic cerebral hypoperfusion. *Curr Neurovasc Res*, **8**, 190-199.
- Scaife, R. & Margolis, R.L. (1990) Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *J Cell Biol*, **111**, 3023-3033.
- Scimemi, A. & Diamond, J.S. (2012) The number and organization of Ca²⁺ channels in the active zone shapes neurotransmitter release from Schaffer collateral synapses. *J Neurosci*, **32**, 18157-18176.
- Schafer, M.K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E. & Erickson, J.D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, **277**, 50734-50748.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. & Montecucco, C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, **359**, 832-835.

- Schiavo, G., Gu, Q.M., Prestwich, G.D., Sollner, T.H. & Rothman, J.E. (1996) Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13327-13332.
- Schikorski, T. & Stevens, C.F. (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*, **17**, 5858-5867.
- Schlicker, E. & Kathmann, M. (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 565-572.
- Schluter, O.M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci*, **24**, 6629-6637.
- Schmidt, H., Brachtendorf, S., Arendt, O., Hallermann, S., Ishiyama, S., Bornschein, G., Gall, D., Schiffmann, S.N., Heckmann, M. & Eilers, J. (2013) Nanodomain coupling at an excitatory cortical synapse. *Curr Biol*, **23**, 244-249.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P.A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W. & Jakobs, K.H. (2001) A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol*, **3**, 1020-1024.
- Schmied, R. & Holtzman, E. (1987) A phosphatase activity and a synaptic vesicle antigen in multivesicular bodies of frog retinal photoreceptor terminals. *J Neurocytol*, **16**, 627-637.
- Schneggenburger, R., Han, Y. & Kochubey, O. (2012) Ca(2+) channels and transmitter release at the active zone. *Cell Calcium*, **52**, 199-207.
- Schneggenburger, R., Meyer, A.C. & Neher, E. (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*, **23**, 399-409.
- Schneggenburger, R. & Neher, E. (2005) Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 266-274.
- Schoch, S., Castillo, P.E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C. & Sudhof, T.C. (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, **415**, 321-326.
- Schulte, A., Lorenzen, I., Bottcher, M. & Plieth, C. (2006) A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods*, **2**, 7.
- Schuske, K.R., Richmond, J.E., Matthies, D.S., Davis, W.S., Runz, S., Rube, D.A., van der Bliek, A.M. & Jorgensen, E.M. (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*, **40**, 749-762.

- Seagar, M., Leveque, C., Charvin, N., Marqueze, B., Martin-Moutot, N., Boudier, J.A., Boudier, J.L., Shoji-Kasai, Y., Sato, K. & Takahashi, M. (1999) Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 289-297.
- Seino, S. & Shibasaki, T. (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev*, **85**, 1303-1342.
- Sejnowski, T.J. (1977) Storing covariance with nonlinearly interacting neurons. *J Math Biol*, **4**, 303-321.
- Serra-Pages, C., Kedersha, N.L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A. & Streuli, M. (1995) The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J*, **14**, 2827-2838.
- Shen, J., Tareste, D.C., Paumet, F., Rothman, J.E. & Melia, T.J. (2007) Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell*, **128**, 183-195.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S. & Thayer, S.A. (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci*, **16**, 4322-4334.
- Shen, P., Liu, M.H., Ng, T.Y., Chan, Y.H. & Yong, E.L. (2006a) Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro. *J Nutr*, **136**, 899-905.
- Shen, W., Wu, B., Zhang, Z., Dou, Y., Rao, Z.R., Chen, Y.R. & Duan, S. (2006b) Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron*, **50**, 401-414.
- Shibuki, K. & Kimura, S. (1997) Dynamic properties of nitric oxide release from parallel fibres in rat cerebellar slices. *J Physiol*, **498 (Pt 2)**, 443-452.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*, **17**, 7503-7522.
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. & Yokoyama, S. (2007) Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, **129**, 761-772.
- Shin, O.H., Lu, J., Rhee, J.S., Tomchick, D.R., Pang, Z.P., Wojcik, S.M., Camacho-Perez, M., Brose, N., Machius, M., Rizo, J., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2010) Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 280-288.
- Shpetner, H.S. & Vallee, R.B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, **59**, 421-432.

- Shupliakov, O. & Brodin, L. (2010) Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles. *Exp Cell Res*, **316**, 1344-1350.
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P. & Brodin, L. (1997) Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, **276**, 259-263.
- Siegel, G.J. (2006) *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*. Elsevier Academic, Burlington, MA.
- Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J.P., Boudier, T., Ohtsuka, T., Fejtova, A., Kao, H.T., Greengard, P., Gundelfinger, E.D., Triller, A. & Marty, S. (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci*, **27**, 6868-6877.
- Siksou, L., Triller, A. & Marty, S. (2009) An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *J Neurochem*, **108**, 1336-1342.
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M. & Tonegawa, S. (1992) Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, **257**, 206-211.
- Sillitoe, R.V. & Joyner, A.L. (2007) Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 549-577.
- Sim, L.J., Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. & Childers, S.R. (1996) Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci*, **16**, 8057-8066.
- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S. & Schmid, S.L. (1999) SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol*, **1**, 119-124.
- Singla, S., Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. (2007) Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression. *J Neurosci*, **27**, 5260-5264.
- Sjostrom, P.J., Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2003) Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron*, **39**, 641-654.
- Sjostrom, P.J., Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2004) Endocannabinoid-dependent neocortical layer-5 LTD in the absence of postsynaptic spiking. *J Neurophysiol*, **92**, 3338-3343.
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. & Leon, A. (1996) The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3984-3989.

- Skosnik, P.D., Edwards, C.R., O'Donnell, B.F., Steffen, A., Steinmetz, J.E. & Hetrick, W.P. (2008) Cannabis use disrupts eyeblink conditioning: evidence for cannabinoid modulation of cerebellar-dependent learning. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 1432-1440.
- Smillie, K.J. & Cousin, M.A. (2012) Akt/PKB controls the activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Traffic*, **13**, 1004-1011.
- Smith, R.B., Machamer, J.B., Kim, N.C., Hays, T.S. & Marques, G. (2012) Relay of retrograde synaptogenic signals through axonal transport of BMP receptors. *J Cell Sci*, **125**, 3752-3764.
- Smythe, E., Carter, L.L. & Schmid, S.L. (1992) Cytosol- and clathrin-dependent stimulation of endocytosis in vitro by purified adaptors. *J Cell Biol*, **119**, 1163-1171.
- Soler-Llavina, G.J. & Sabatini, B.L. (2006) Synapse-specific plasticity and compartmentalized signaling in cerebellar stellate cells. *Nat Neurosci*, **9**, 798-806.
- Song, J.Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T.C. & Brose, N. (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1100-1105.
- Song, Z.H. & Bonner, T.I. (1996) A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol Pharmacol*, **49**, 891-896.
- Spafford, J.D. & Zamponi, G.W. (2003) Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 308-314.
- Sparks, A.B., Hoffman, N.G., McConnell, S.J., Fowlkes, D.M. & Kay, B.K. (1996) Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol*, **14**, 741-744.
- Spassky, N., Han, Y.G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M.R., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2008) Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol*, **317**, 246-259.
- Staras, K., Branco, T., Burden, J.J., Pozo, K., Darcy, K., Marra, V., Ratnayaka, A. & Goda, Y. (2010) A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons. *Neuron*, **66**, 37-44.
- Stefan, M.I., Edelstein, S.J. & Le Novere, N. (2008) An allosteric model of calmodulin explains differential activation of PP2B and CaMKII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10768-10773.
- Stein, A., Radhakrishnan, A., Riedel, D., Fasshauer, D. & Jahn, R. (2007) Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca²⁺-dependent trans interaction with phospholipids. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 904-911.
- Stella, N. & Piomelli, D. (2001) Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol*, **425**, 189-196.

- Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, **388**, 773-778.
- Stephens, G.J. (2009) G-protein-coupled-receptor-mediated presynaptic inhibition in the cerebellum. *Trends Pharmacol Sci*, **30**, 421-430.
- Sternberg, S.R. (1983) Biomedical Image-Processing. *Computer*, **16**, 22-34.
- Stevens, C.F. & Williams, J.H. (2000) "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12828-12833.
- Straiker, A. & Mackie, K. (2005) Depolarization-induced suppression of excitation in murine autaptic hippocampal neurones. *J Physiol*, **569**, 501-517.
- Sudhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.
- Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.
- Sudhof, T.C. (2012a) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353.
- Sudhof, T.C. (2012b) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. & Waku, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 89-97.
- Surkova, I.N. & Grishin, E.V. (1991) Presynaptic alpha-latrotoxin receptor components interact with protein p65 of synaptic vesicle membranes. *Biomed Sci*, **2**, 417-420.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**, 347-353.
- Szabo, B., Urbanski, M.J., Bisogno, T., Di Marzo, V., Mendiguren, A., Baer, W.U. & Freiman, I. (2006) Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol*, **577**, 263-280.
- Szaszak, M., Gaborik, Z., Turu, G., McPherson, P.S., Clark, A.J., Catt, K.J. & Hunyady, L. (2002) Role of the proline-rich domain of dynamin-2 and its interactions with Src homology 3 domains during endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem*, **277**, 21650-21656.

- Tabb, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R. & Ueda, T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*, **267**, 15412-15418.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. & Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, **127**, 831-846.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, **407**, 189-194.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. & Jahn, R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*, **21**, RC182.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. & De Camilli, P. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, **374**, 186-190.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. & De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol*, **133**, 1237-1250.
- Tan, T.C., Valova, V.A., Malladi, C.S., Graham, M.E., Berven, L.A., Jupp, O.J., Hansra, G., McClure, S.J., Sarcevic, B., Boadle, R.A., Larsen, M.R., Cousin, M.A. & Robinson, P.J. (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 701-710.
- Tang, Y. & Zucker, R.S. (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron*, **18**, 483-491.
- Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron*, **65**, 320-327.
- Taylor, M.J., Perrais, D. & Merrifield, C.J. (2011) A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, **9**, e1000604.
- Teng, H., Lin, M.Y. & Wilkinson, R.S. (2007) Macroendocytosis and endosome processing in snake motor boutons. *J Physiol*, **582**, 243-262.
- Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G. & Sprang, S.R. (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTPgammaS. *Science*, **278**, 1907-1916.
- Tian, X., Guo, J., Yao, F., Yang, D.P. & Makriyannis, A. (2005) The conformation, location, and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. *J Biol Chem*, **280**, 29788-29795.

- Toggenburger, G., Wiklund, L., Henke, H. & Cuenod, M. (1983) Release of endogenous and accumulated exogenous amino acids from slices of normal and climbing fibre-deprived rat cerebellar slices. *J Neurochem*, **41**, 1606-1613.
- Tolbert, L.P. & Morest, D.K. (1982) The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: electron microscopy. *Neuroscience*, **7**, 3053-3067.
- tom Dieck, S., Sanmarti-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kampf, U., Franzer, J.T., Stumm, M., Garner, C.C. & Gundelfinger, E.D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*, **142**, 499-509.
- Toonen, R.F., Wierda, K., Sons, M.S., de Wit, H., Cornelisse, L.N., Brussaard, A., Plomp, J.J. & Verhage, M. (2006) Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18332-18337.
- Tornqvist, H. & Belfrage, P. (1976) Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem*, **251**, 813-819.
- Traub, L.M. (2003) Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol*, **163**, 203-208.
- Trazzi, S., Steger, M., Mitrugno, V.M., Bartesaghi, R. & Ciani, E. (2010) CB1 cannabinoid receptors increase neuronal precursor proliferation through AKT/glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, **285**, 10098-10109.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M. & Scheller, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4538-4542.
- Tsetsenis, T., Younts, T.J., Chiu, C.Q., Kaeser, P.S., Castillo, P.E. & Sudhof, T.C. (2011) Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 14300-14305.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K. & Walker, J.M. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **83**, 393-411.
- Turner, J.V., Agatonovic-Kustrin, S. & Glass, B.D. (2007) Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *J Pharm Sci*, **96**, 1879-1885.
- Turrigiano, G.G. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, **135**, 422-435.
- Twitchell, W., Brown, S. & Mackie, K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 43-50.

- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. & Takeichi, M. (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*, **135**, 767-779.
- Ueno, H., Shibasaki, T., Iwanaga, T., Takahashi, K., Yokoyama, Y., Liu, L.M., Yokoi, N., Ozaki, N., Matsukura, S., Yano, H. & Seino, S. (2001) Characterization of the gene EPAC2: structure, chromosomal localization, tissue expression, and identification of the liver-specific isoform. *Genomics*, **78**, 91-98.
- Ungewickell, E. & Branton, D. (1981) Assembly units of clathrin coats. *Nature*, **289**, 420-422.
- Ungewickell, E.J. & Hinrichsen, L. (2007) Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 417-425.
- Valtorta, F., Tarelli, F.T., Campanati, L., Villa, A. & Greengard, P. (1989) Synaptophysin and synapsin I as tools for the study of the exo-endocytotic cycle. *Cell Biol Int Rep*, **13**, 1023-1038.
- Vallano, M.L., Beaman-Hall, C.M., Bui, C.J. & Middleton, F.A. (2006) Depolarization and Ca(2+) down regulate CB1 receptors and CB1-mediated signaling in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, **50**, 651-660.
- van den Bogaart, G., Thutupalli, S., Risselada, J.H., Meyenberg, K., Holt, M., Riedel, D., Diederichsen, U., Herminghaus, S., Grubmüller, H. & Jahn, R. (2011) Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 805-812.
- van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 112-124.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D. & Sharkey, K.A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**, 329-332.
- Vandevorde, S. & Lambert, D.M. (2007) The multiple pathways of endocannabinoid metabolism: a zoom out. *Chem Biodivers*, **4**, 1858-1881.
- Varma, N., Brager, D., Morishita, W., Lenz, R.A., London, B. & Alger, B. (2002) Presynaptic factors in the regulation of DSI expression in hippocampus. *Neuropharmacology*, **43**, 550-562.
- Varma, N., Carlson, G.C., Ledent, C. & Alger, B.E. (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci*, **21**, RC188.
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K. & Rosenmund, C. (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9037-9042.

- Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J. & Sudhof, T.C. (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, **287**, 864-869.
- Vizi, E.S., Kisfali, M. & Lorincz, T. (2013) Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain Res Bull*, **93**, 32-38.
- Vogel, Z., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E. & Mechoulam, R. (1993) Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *J Neurochem*, **61**, 352-355.
- Voglmaier, S.M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D.L., Hua, Z., Nicoll, R.A. & Edwards, R.H. (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*, **51**, 71-84.
- von Gersdorff, H. (2001) Synaptic ribbons: versatile signal transducers. *Neuron*, **29**, 7-10.
- Vos, M., Lauwers, E. & Verstreken, P. (2010) Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front Synaptic Neurosci*, **2**, 139.
- Wager-Miller, J., Westenbroek, R. & Mackie, K. (2002) Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*, **121**, 83-89.
- Walther, K., Diril, M.K., Jung, N. & Haucke, V. (2004) Functional dissection of the interactions of stonin 2 with the adaptor complex AP-2 and synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 964-969.
- Walther, K., Krauss, M., Diril, M.K., Lemke, S., Ricotta, D., Honing, S., Kaiser, S. & Haucke, V. (2001) Human stoned B interacts with AP-2 and synaptotagmin and facilitates clathrin-coated vesicle uncoating. *EMBO Rep*, **2**, 634-640.
- Wan, H.I., DiAntonio, A., Fetter, R.D., Bergstrom, K., Strauss, R. & Goodman, C.S. (2000) Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, **26**, 313-329.
- Wang, X., Hu, B., Zieba, A., Neumann, N.G., Kasper-Sonnenberg, M., Honsbein, A., Hultqvist, G., Conze, T., Witt, W., Limbach, C., Geitmann, M., Danielson, H., Kolarow, R., Niemann, G., Lessmann, V. & Kilmann, M.W. (2009) A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1. *J Neurosci*, **29**, 12584-12596.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. & Sudhof, T.C. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, **388**, 593-598.
- Wang, Y., Sugita, S. & Sudhof, T.C. (2000) The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem*, **275**, 20033-20044.

- Wei, G., Yin, Y., Li, W., Bito, H., She, H. & Mao, Z. (2012) Calpain-mediated degradation of myocyte enhancer factor 2D contributes to excitotoxicity by activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, **287**, 5797-5805.
- Wenk, M.R. & De Camilli, P. (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8262-8269.
- Wenk, M.R., Pellegrini, L., Klenchin, V.A., Di Paolo, G., Chang, S., Daniell, L., Arioka, M., Martin, T.F. & De Camilli, P. (2001) PIP kinase Igama is the major PI(4,5)P(2) synthesizing enzyme at the synapse. *Neuron*, **32**, 79-88.
- Wenzel, E.M., Morton, A., Ebert, K., Welzel, O., Kornhuber, J., Cousin, M.A. & Groemer, T.W. (2012) Key physiological parameters dictate triggering of activity-dependent bulk endocytosis in hippocampal synapses. *PLoS One*, **7**, e38188.
- Wilson, R.I. & Nicoll, R.A. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, **410**, 588-592.
- Willox, A.K. & Royle, S.J. (2012) Stonin 2 is a major adaptor protein for clathrin-mediated synaptic vesicle retrieval. *Curr Biol*, **22**, 1435-1439.
- Winther, A.M., Jiao, W., Vorontsova, O., Rees, K.A., Koh, T.W., Sopova, E., Schulze, K.L., Bellen, H.J. & Shupliakov, O. (2013) The dynamin-binding domains of Dap160/Intersectin affect bulk membrane retrieval in synapses. *J Cell Sci*.
- Wolosker, H., de Souza, D.O. & de Meis, L. (1996) Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J Biol Chem*, **271**, 11726-11731.
- Wong, F.K. & Stanley, E.F. (2010) Rab3a interacting molecule (RIM) and the tethering of pre-synaptic transmitter release site-associated CaV2.2 calcium channels. *J Neurochem*, **112**, 463-473.
- Wu, S., Liu, J., Reedy, M.C., Tregear, R.T., Winkler, H., Franzini-Armstrong, C., Sasaki, H., Lucaveche, C., Goldman, Y.E., Reedy, M.K. & Taylor, K.A. (2010) Electron tomography of cryofixed, isometrically contracting insect flight muscle reveals novel actin-myosin interactions. *PLoS One*, **5**.
- Wu, W. & Wu, L.G. (2007) Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10234-10239.
- Wu, X.S., McNeil, B.D., Xu, J., Fan, J., Xue, L., Melicoff, E., Adachi, R., Bai, L. & Wu, L.G. (2009) Ca(2+) and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci*, **12**, 1003-1010.

- Wucherpennig, T., Wilsch-Brauninger, M. & Gonzalez-Gaitan, M. (2003) Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol*, **161**, 609-624.
- Xing, Y., Bocking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T. & Harrison, S.C. (2010) Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J*, **29**, 655-665.
- Xu-Friedman, M.A., Harris, K.M. & Regehr, W.G. (2001) Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, **21**, 6666-6672.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X. & Fan, X. (2013) Bergmann Glia Function in Granule Cell Migration During Cerebellum Development. *Mol Neurobiol*.
- Xu, J., McNeil, B., Wu, W., Nees, D., Bai, L. & Wu, L.G. (2008) GTP-independent rapid and slow endocytosis at a central synapse. *Nat Neurosci*, **11**, 45-53.
- Xue, L., Sheng, J., Wu, X.S., Wu, W., Luo, F., Shin, W., Chiang, H.C. & Wu, L.G. (2013) Most vesicles in a central nerve terminal participate in recycling. *J Neurosci*, **33**, 8820-8826.
- Xue, M., Craig, T.K., Xu, J., Chao, H.T., Rizo, J. & Rosenmund, C. (2010) Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 568-575.
- Yamagata, M., Herman, J.P. & Sanes, J.R. (1995) Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci*, **15**, 4556-4571.
- Yang, X., Kaeser-Woo, Y.J., Pang, Z.P., Xu, W. & Sudhof, T.C. (2010) Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca(2+) sensor via its accessory alpha helix. *Neuron*, **68**, 907-920.
- Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., Wang, Y.X., Petralia, R.S., Tu, W., Zhu, L.Q., Wang, J.Z. & Lu, Y. (2012) EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron*, **73**, 774-788.
- Yao, C.K., Lin, Y.Q., Ly, C.V., Ohyama, T., Haueter, C.M., Moiseenkova-Bell, V.Y., Wensel, T.G. & Bellen, H.J. (2009) A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell*, **138**, 947-960.
- Yao, J., Qi, J. & Chen, G. (2006) Actin-dependent activation of presynaptic silent synapses contributes to long-term synaptic plasticity in developing hippocampal neurons. *J Neurosci*, **26**, 8137-8147.
- Yasuda, H., Huang, Y. & Tsumoto, T. (2008) Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3106-3111.

- Yoshida, T., Fukaya, M., Uchigashima, M., Miura, E., Kamiya, H., Kano, M. & Watanabe, M. (2006) Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*, **26**, 4740-4751.
- Yoshida, T., Hashimoto, K., Zimmer, A., Maejima, T., Araishi, K. & Kano, M. (2002) The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, **22**, 1690-1697.
- Yu, E., Kanno, E., Choi, S., Sugimori, M., Moreira, J.E., Llinas, R.R. & Fukuda, M. (2008) Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 16003-16008.
- Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Sudhof, T.C. & Anderson, R.G. (1994) Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell*, **78**, 751-760.
- Zhang, L. & Goldman, J.E. (1996) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron*, **16**, 47-54.
- Zhen, M. & Jin, Y. (1999) The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*. *Nature*, **401**, 371-375.
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolia, K.F., Bikoff, J.B., Hong, E.J., Greenberg, M.E. & Segal, R.A. (2007) Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*, **55**, 53-68.
- Zimmermann, H., Volknandt, W., Henkel, A., Bonzelius, F., Janetzko, A. & Kanaseki, T. (1989) The synaptic vesicle membrane: origin, axonal distribution, protein components, exocytosis and recycling. *Cell Biol Int Rep*, **13**, 993-1006.
- Zimmermann, H., Volknandt, W., Wittich, B. & Hausinger, A. (1993) Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J Physiol Paris*, **87**, 159-170.

VIII- Anexos

"No se pueden patentar las ideas. Somos sus vectores, no sus dueños"

Anónimo.

Anexo I

A modo de Anexo I el protocolo para la realización de experimentos de inmunocitoquímica *post-hoc* en su formato de publicación como artículo metodológico en la revista *BMC Neuroscience*.

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling

Jorge Ramírez-Franco, Beatris Alonso, David Bartolomé-Martín, José Sánchez-Prieto* and Magdalena Torres*

Abstract

Background: In terms of vesicular recycling, synaptic efficiency is a key determinant of the fidelity of synaptic transmission. The ability of a presynaptic terminal to reuse its vesicular content is thought to be a signature of synaptic maturity and this process depends on the activity of several proteins that govern exo/endocytosis. Upon stimulation, individual terminals in networks of cultured cerebellar granule neurons exhibit heterogeneous exocytic responses, which reflect the distinct states of maturity and plasticity intrinsic to individual synaptic terminals. This dynamic scenario serves as the substrate for processes such as scaling, plasticity and synaptic weight redistribution. Presynaptic strength has been associated with the activity of several types of proteins, including the scaffolding proteins that form the active zone cytomatrix and the proteins involved in presynaptic exocytosis.

Methods: We have combined fluorescence imaging techniques using the styryl dye FM1-43 in primary cultures of cerebellar granule cells with subsequent *post-hoc* immunocytochemistry in order to study synaptic efficiency in terms of vesicular release. We describe a protocol to easily quantify these results with minimal user intervention.

Results: In this study we describe a technique that specifically correlates presynaptic activity with the levels of presynaptic markers. This method involves the use of the styryl dye FM1-43 to estimate the release capacity of a synaptic terminal, and the subsequent *post-hoc* immunolabelling of thousands of individual nerve terminals. We observed a strong correlation between the release capacity of the nerve terminal and the levels of the RIM1 α but not the Munc13-1 protein in the active zone.

Conclusions: Our findings support those of previous studies and point out to RIM1 α as a crucial factor in determining synaptic efficiency. These results also demonstrate that this technique is a useful tool to analyse the molecular differences underlying the heterogeneous responses exhibited by neuronal networks.

Keywords: *Post-hoc* immunocytochemistry, FM1-43, Synaptic vesicle exocytosis, RIM1 α , Munc13-1

Background

Presynaptic active zones (AZ) are specialized axonal sites of fusion that mediate neurotransmitter release into chemical synapses. A complex network of proteins is assembled at axonal sites that generate the so-called cytomatrix at the active zone (CAZ). These proteins interact with other proteins located either at the presynaptic plasma membrane or at vesicular membranes that regulate Ca²⁺-dependent fusion of synaptic vesicles. The different stages of the synaptic vesicular cycle (docking, priming, exocytosis and compensatory endocytosis) are orchestrated by distinct subsets of proteins, and the amount and interaction of

these different proteins are thought to be crucial in determining presynaptic strength. The capacity of a given synapse to efficiently reuse synaptic vesicles has been proposed as a hallmark of maturation, and differences in vesicular reuse appear to underlie the enormous variability of responses observed in cultured neuronal networks [1]. Remodelling of the active zone through changes in protein content or post-translational modifications has been linked with several crucial mechanisms involved in synaptic physiology, including presynaptic potentiation/depression, homeostatic synaptic scaling, synaptic silencing and synaptic weight redistribution [2-7].

In the present study, we focused on RIM1 α as this protein is a key organizer of the active zone and it interacts directly or indirectly with all other known

* Correspondence: jsprieto@vet.ucm.es; mitorres@vet.ucm.es
Departamento de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

active zone proteins, including Rab3A and Munc13 [8]. Indeed, the RIM proteins are required for synaptic vesicle priming and both short- and long-term synaptic plasticity [9-12]. These RIMs tether Ca^{2+} channels to the presynaptic active zone [13] and activate vesicle priming by reversing the autoinhibitory homodimerization of Munc13 [14]. Moreover, the RIM1/2 content is linearly associated with release probability and the size of the active zone [7]. Consistent with this central role, Rim deletion prevents neurotransmitter release [13]. In addition to RIM1 α , we also analyzed Munc13-1, given the key role of Munc13 proteins in priming synaptic vesicles to a fusion-competent state [15] and in short-term potentiation of transmitter release [15-17].

Post-hoc immunocytochemistry and immunohistochemistry have previously been used to study synaptic and neuronal function [1,18-20], yet to date, no detailed method to perform and analyse these experiments has been described. Here, we present a method that combines the assessment of presynaptic function in primary cultures of cerebellar granule neurons by monitoring synaptic vesicle recycling using the styryl dye FM1-43 with subsequent *post-hoc* immunocytochemistry. In addition, we describe a semi-automated protocol to easily quantify the data obtained, which enables the levels of immunoreactivity (IR) to be correlated with synaptic efficiency.

Methods

FM1-43 live cell imaging

To assess presynaptic activity we used cultures of cerebellar granule neurons that are largely populated by glutamatergic neurons [21-23]. All experiments were carried out in accordance with the guidelines established by the National Council on Animal Care and were approved by the local Animal Care Committee of the Universidad Complutense de Madrid (UCM, Madrid, Spain) following European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU). Every possible effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used. Cultures were prepared as described previously [1] and the cells were seeded at a final density of 3×10^5 cells per coverslip. Synaptic efficiency was assessed after 7 days *in vitro* (DIV; Figure 1, step 1) as follows. Briefly, cells were incubated for 10 minutes at 37°C in a calcium-free, low-potassium buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES [pH 7.4]), and then for 90 seconds at 37°C with 10 μM FM1-43 (Invitrogen) in high-potassium buffer (95 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.33 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES [pH 7.4]). The coverslips were then mounted in a PH5 perfusion chamber (Warner instruments) and the surface-bound dye was removed by

perfusion of a calcium-free low-potassium buffer for 10 minutes. For subsequent immunocytochemical experiments we did not use any kind of vacuum grease as the superficial tension of the remaining aqueous interphase of the coverslip was sufficient to prevent solution leakage. Perfusion into the chamber was performed using a VC6 perfusion system (Warner instruments) and all solutions were maintained at 37°C using a TC-344B temperature controlling system (Warner instruments). Baseline measurements were acquired over 30 seconds while perfusing low-potassium medium, after which the cells were stimulated for 10 seconds with the high-potassium medium, resulting in dye unloading. Short stimulation periods were chosen to minimize the unreliable homogeneity of responses that can occur during overstimulation of neuronal networks. During the experiment images were acquired at a rate of 1 Hz using a Nikon Eclipse TE2000-S microscope equipped with a Nikon CFI Plan Apo VC 60 \times Oil objective 1.4 (NA) and a CCD camera (iXon^{EM} + DU885, Andor Technology). A 479 nm monochromator was used for excitation and the emitted light was collected using a fluorescein isothiocyanate (FITC) filter. Once the imaging period was over, the cells were maintained at rest by perfusing low-potassium buffer and several phase contrast images were acquired at different magnifications (60 \times , 40 \times and 20 \times) to serially reconstruct the exact field used in the experiment at a lower magnification (Additional file 1: Figure S1). This serial reconstruction allowed us to locate the corresponding field after performing immunocytochemical experiments. The protocol used is described below and corresponds to step 2 in Figure 1; **1 Accommodation period:** Maintain the cells for 10 minutes in low-potassium buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES [pH 7.4]) at 37°C; **2 Loading step:** Incubate the cells with the loading solution in high-potassium buffer in order to stain the synaptic vesicles (95 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.33 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES [pH 7.4] and 10 μM FM1-43 [Invitrogen]) at 37°C; **3 Mounting:** Mount the coverslip in the perfusion chamber. It is important to do this rapidly to prevent the coverslip from drying. For a scheme to clarify this step, see Cheung and Cousin, 2011 [24]. Several different commercial and custom-built chambers can be used; **4 Wash-out period:** Once mounted in the chamber, wash the excess of externally bound dye from the coverslip by perfusion of a low-potassium, calcium-free buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, 10 mM HEPES [pH 7.4]) at 37°C for 10 minutes at a constant flow of 1 ml/min; **5 Imaging of the SV cycle:** Image acquisition can be performed at

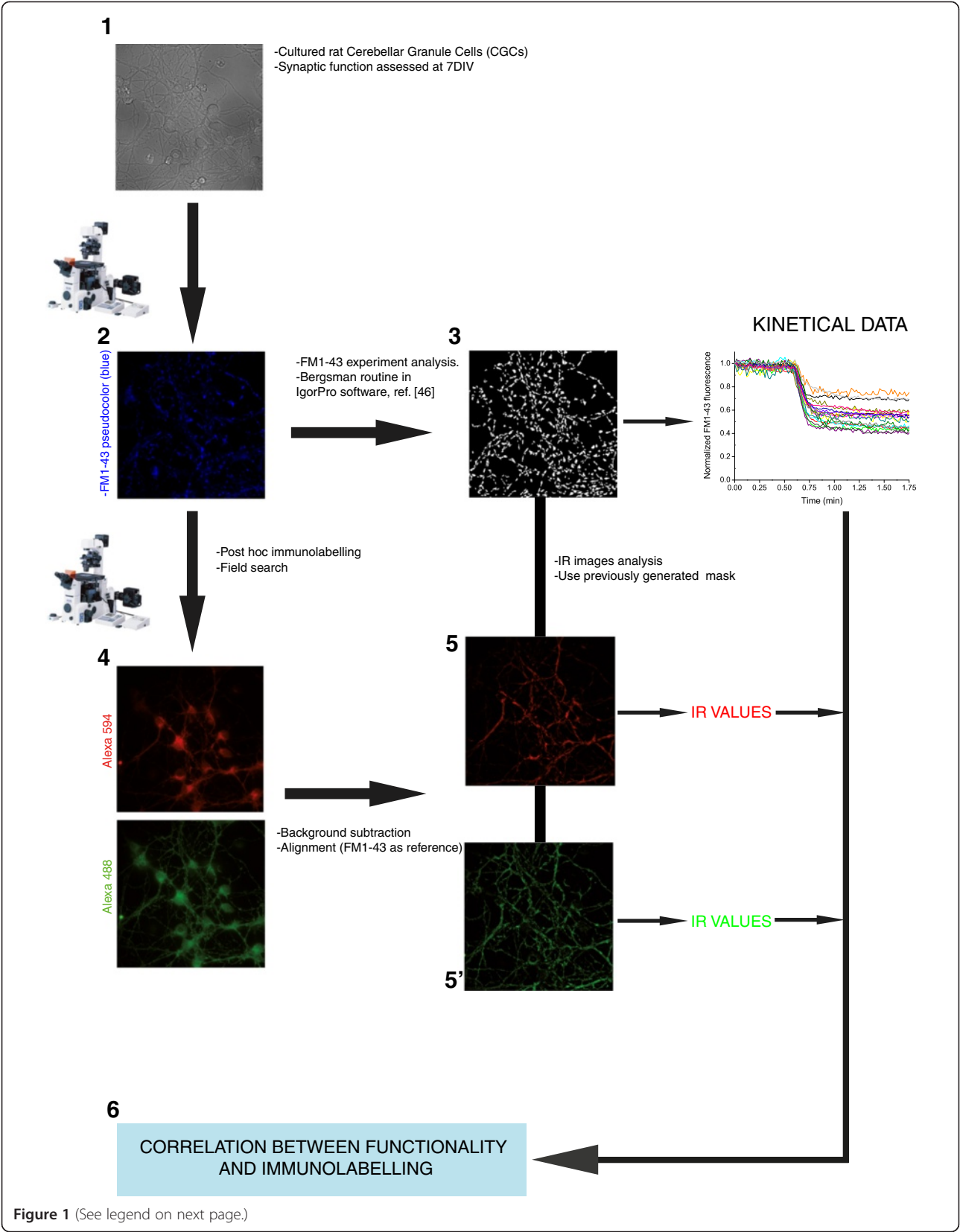


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 Graphical abstract of FM1-43 experiments and subsequent post-hoc immunolabelling. Each number represents a different step in the protocol detailed throughout the paper. Briefly, 7DIV cultured cerebellar granule cells (1) were used to assess synaptic efficiency by means of FM1-43 experiments (2). Then, experiment analysis (3) was performed using the routine described in [46]. Cells were then labelled with antibodies against different presynaptic proteins (4). After alignment and analysis of the acquired images (5) the immunoreactivity measurements were correlated with the data obtained in the functional experiment (6).

different frequencies. In this protocol we recorded at a rate of 1 frame per second (1 Hz), with the excitation wavelength set at 479 nm, and we collected the emitted light through a FITC filter (520/540 nm). We acquired 30 frames to define the baseline period (a shorter baseline period can also be used but is less optimal to ensure baseline stability) and then stimulated for the desired period by perfusing with a high-potassium solution. Shorter stimulation periods are associated with greater heterogeneity in the whole population of responses. The images were acquired with a CCD camera operating at 14 bits (iXon^{EM} + DU885, Andor Technology). Once image acquisition has ended, several images of the exact field imaged in the experiment and of the surrounding regions are collected at lower magnification. This is useful to build a serial reconstruction that helps define the exact field visualized during the experiment; **6 Coverslip removal:** Remove the microscope adapter without disassembling the perfusion chamber and extract the upper coverslip from the chamber. Then, unscrew the chamber from the microscope adapter and press the lower coverslip gently onto one of its edges with fine-tip surgical tweezers while pulling the entire chamber away from the platform. In this way it is possible to retrieve the coverslip almost intact from the slot in the platform. The subsequent immunocytochemical experiment should be commenced immediately and the collected data stored in a multidimensional *.TIFF file.

Post-hoc immunocytochemistry

Antibodies

The following antibodies were used in the present study: a mouse monoclonal anti-Munc13-1, (1:1000; ref. 126 111 Synaptic Systems); a rabbit polyclonal anti-RIM1 (1:400; ref. 140 003 Synaptic Systems); and a guinea pig polyclonal anti-CB1R (1:300; ref. CB1-GP-Af530, Frontier Institute Co., Ltd.), the latter used exclusively as a presynaptic marker to obtain a positive linear relationship between the channels. To check for the specificity of the antibodies we performed western blot experiments as previously described [1]. Both antibodies recognized a single band with the expected molecular weight for both proteins (Additional file 2: Figure S2). The western blot protocol is described in Additional file 3.

Labelling procedures

To study the potential relationship between vesicular release efficiency and the levels of presynaptic proteins

involved in neurotransmitter release, we selected two proteins with well-established roles in neurotransmitter release: Munc13-1 [16,25] and RIM1 α [13,26]. Even when the amount of protein and the intensity of immunoreactivity are not linearly related [27], immunocytochemical analysis is the only possible means of exploring the differences in protein content in subcellular compartments and relating these to functional parameters (in this case vesicular release). Moreover, several studies have used IR intensity as a means of estimating relative amounts of synaptic proteins [2-4,28,29], although some changes in synaptic protein composition that can be demonstrated by proteomic techniques can also be detected by semi-quantitative analysis [30]. After removing the coverslips from the platform they were rinsed once in PBS at 37°C in order to detach the cell debris that might have formed during the experiment. The coverslips were then fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature (RT), washed twice for 5 minutes in PBS and then permeabilized for 6 minutes with PBS-0.2% Triton X-100 at RT. Before immunostaining, the cells were blocked for 1 hour at 37°C in a solution containing PBS-0.05 Triton X-100, 5% donkey serum and 5% goat serum (both from Jackson ImmunoResearch). The cells were then incubated overnight (o/n) at 4°C with the primary antibodies. Double immunocytochemistry for presynaptic markers is recommended even when only one marker will be used for further analysis, and staining in two different channels is useful to obtain a linear relationship between markers. Positive slope values (close to 1) for this relationship and strong correlation values are *bona fide* indicators of the validity of individual experiments (see section FM1-43 experiment and *post-hoc* immunocytochemistry and Figure 2). After exposure to the antibodies the cells were washed 5 times for 5 minutes each, and they were then incubated with Alexa (Molecular Probes, Invitrogen)-labeled secondary antibodies (alexa fluor 488 anti-mouse, goat 1:200; alexa fluor 488 anti-rabbit, goat 1:200 and alexa fluor 594 anti-guinea pig, goat 1:200) for 1 hour at 37°C. After washing, the coverslips were mounted with Prolong Antifade with DAPI (Invitrogen). The protocol used is described below:

1 Fixation and blocking: After the removal of the coverslip, rinse it thoroughly in PBS at 37°C and fix by immersion in 4% paraformaldehyde for 15 minutes. Wash twice in PBS and permeabilize the cells for 6 minutes in

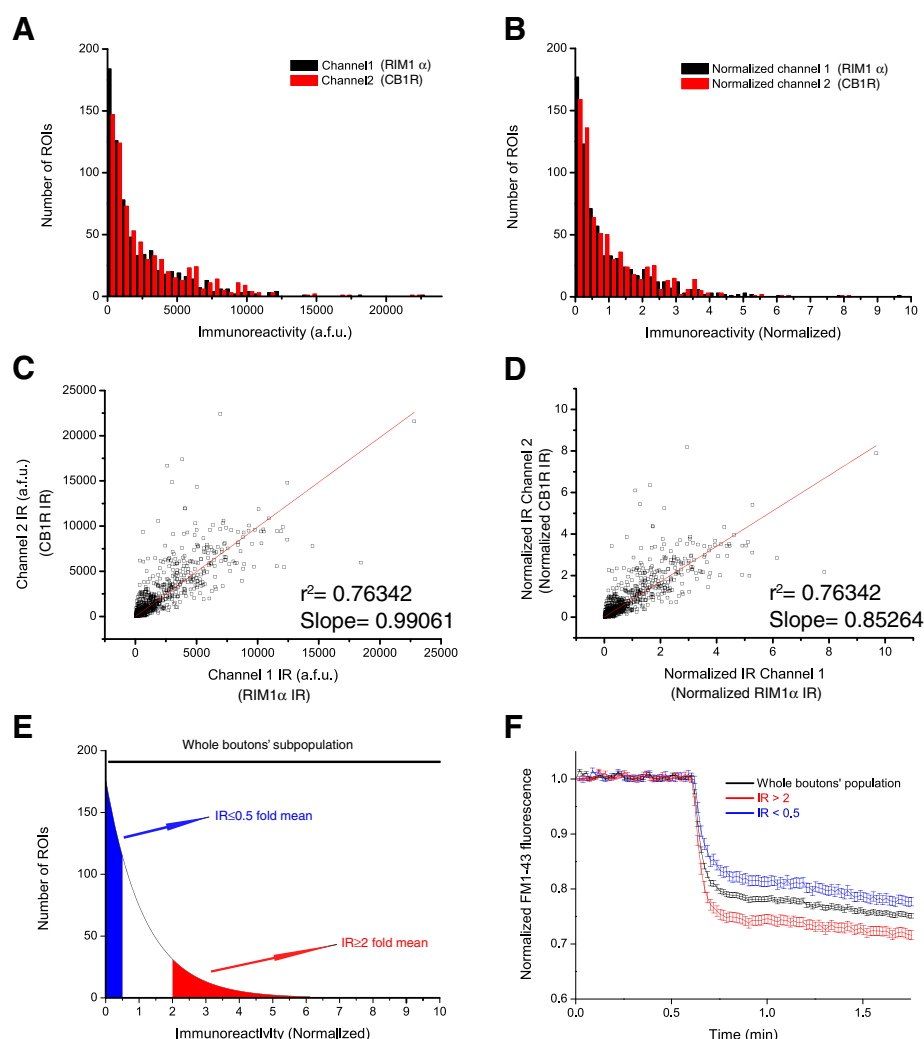


Figure 2 Alignment of the different channels used for post-hoc ICC. Measured IR values for two presynaptic markers in each one of the individual ROIs: channel 1 (Alexa 488, anti-RIM1 α in this case) and channel 2 (Alexa 594, anti-CB1R in this case) are shown in a.f.u (arbitrary fluorescence units) (A) or normalized to their mean IR value (B). Distribution of IR values of channel 1 (black bars) and channel 2 (red bars) in arbitrary fluorescence units (C) and normalized to mean levels (D). (E) Graphical representation of the distribution of normalized IR values (<0.5 and >2 fold mean in blue and red, respectively) through the whole population of synaptic boutons. (F) Normalized FM1-43 unloading kinetics of the three groups of synaptic boutons according to their RIM1 α IR levels, means \pm S.E.M. are plotted. Data from a single experiment (n = 671 boutons for the whole population trace; n = 96 boutons for IR levels >2, red trace and n = 231 boutons with IR levels < 0.5 mean value).

PBS-0.2% Triton X-100 if immunodetection of intracellular epitopes is required. Wash for 5 minutes in PBS and using a P100 pipette, gently apply 90–100 μ l of blocking solution (PBS + 0.05% Triton \times 100, 5% goat serum, 5% donkey serum) onto the coverslip and incubate for 1 h at 37°C. It is helpful to leave the coverslips on a Parafilm-covered surface during the blocking and subsequent incubations to avoid spillage of the solution from the coverslip; **2 Labelling with primary and secondary antibodies:** Incubate o/n at 4°C with the desired primary antibodies diluted in PBS containing 0.05% Triton X-100 and 2.5%

donkey serum. Wash 3 times in PBS containing 0.1% Triton X-100 and twice in PBS alone. Subsequently, incubate the cells with the specific Alexa-conjugated secondary antibodies for 1 h at 37°C. Wash 5 times in PBS and rinse the covers in MilliQ water to remove excess salts.

FM1-43 experiment and post-hoc immunocytochemical analysis

To carry out a semi-automated and unbiased assay of synaptic efficiency on populations of thousands of individual nerve terminals and to specifically correlate each

individual response with a given IR value, we employed a routine previously described by Bergsman et al. 2006 [46]. This processing technique is extremely useful to avoid manual data selection and analysis, thereby facilitating the statistical analysis of large populations of individual nerve terminals. This routine can be applied using IgorPro software and the data was analyzed as described previously [1]. Briefly, to ensure a minimum quality of the defined/selected regions of interest (ROIs), this routine uses three parameters to classify the responses: the slope of the baseline, the extent of dye unloading, and the coefficient of variation of the baseline. This routine also renders a mask that can be used for further analysis and it provides a set of images in which background subtraction has been performed automatically. The protocol used is described below in detail, and corresponds to step 3 in Figure 1; **1 Data Processing:** Collect the data and save the multidimensional “*.TIFF” file as an image sequence in ImageJ (File > Save as > Image Sequence). Process the image sequence as indicated in Bergsman et al. 2006 [46]. The specific parameters used in this analysis are described in Additional file 4: Figure S3A; **2 Data Transfer:** Once the analysis has finished check “leave folder alone” when prompted, which will save the processed (background subtracted) images in the same folder in which the experimental data is stored. Next, select Data > Browse Waves and save the QualitySegment.ibw file. This file is an Igor Binary Wave (“*.ibw”) file that can be imported as an 8-bit image into ImageJ software (File > Import > Raw), and it is a binary drawing of the mask used for ROI analysis during the experiment. The settings for importing should be adjusted according to the size of the images acquired during the experiment (1004 × 1002 in this protocol: Additional file 4: Figure S3B); **3 Serial Reconstruction:** Build a serial reconstruction of the lower magnification (20×) images acquired at the end of the FM1-43 experiment (step 5 in section FM1-43 live cell imaging and Additional file 1: Figure S1). This operation can be performed automatically with Adobe Photoshop CS3 by loading the cell phase contrast images (File > Automate > Photomerge), although other software packages can also be used to this end; **4 Image localization:** Visually search for the exact field examined in the functional experiment by manually surveillance with minimal clear light intensity to avoid photobleaching of the labelled secondary antibodies. This may take several minutes, depending on the expertise of the investigator; **5 Image acquisition:** Once the field has been found, acquire immunofluorescence images of the field monitored during the experiment at the same magnification (60× in the present protocol). Characteristic hallmarks of the field are useful to help manually align the coverslip before acquiring the immunofluorescence images, taking the FM1-43 experiment as a reference. This operation

minimizes the subsequent digital alignment and reduces the number of lost (non-matching) ROIs during digital processing (step 4 in Figure 1); **6 Background Subtraction:** Perform a rolling ball background subtraction on the images acquired using a 12-pixel ball radius [31]. Take the FM1-43 image as a reference and after merging the channels (Image > Color > Merge Channels), align the images using the Image J Align RGB planes plug-in (<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landing/software/software.html>). Once aligned, split the channels (Image > Color > Split channels) and save the aligned images for posterior analysis (steps 5 and 5' in Figure 1); **7 Establish ROIset:** Generate a ROIset in ImageJ from the “*.ibw” file (Additional file 4: Figure S3B). Import the mask and render a binary drawing (Process > Binary > Make binary). After alignment, some of the edges are usually missing from the immunofluorescence images and the corresponding ROIs must be removed from the binary image. This can be done easily by selecting the missing area in the immunofluorescence image and restoring that selection to the binary drawing. Finally, render the ROIset (Analyze > Analyze particles; tick the options appearing in Additional file 4: Figure S3C) and save this ROIset as a “*.zip” file; **8 Data Acquisition:** Obtain the data from the different images, for which we recommend using the automatically generated background-subtracted images obtained from the IgorPro analysis in order to minimize user manipulation of the images. This is achieved by automatically importing the images generated from the folder in which the experiment was saved (follow the steps indicated in Additional file 4: Figure S3D). After superimposing the ROIset over the images to be analysed, go to the ROIset menu and click More > Multi measure. In the present analysis, integrated densities were used to provide a cumulative measure of the immunoreactivity for each individual ROI [1]. List the results obtained and copy them into a different worksheet (OriginPro 8.0 was used in the present study). Ensure that the same naming system is used for the columns in each worksheet so that the immunoreactivity values will match the kinetic values of each of the ROIs. Subsequently, you can check that the three images are properly aligned by plotting IR in channel 1 (Alexa 488, corresponding to RIM1α immunolabelling in this example) versus IR in channel 2 (Alexa 594, corresponding to CB1R immunolabelling in this case: Figure 2B and 2D). Generate a merged image in which the alignment can also be checked by eye; a line plot of the three channels is also helpful to assess the alignment (Additional file 5: Figure S4A and B); **9 Normalization:** Normalize the IR values by dividing by the mean IR value of each of the channels. Although immunoreactivity levels are not linearly related to the amount of protein [27], by normalizing it is possible to perform a comparative analysis between the edges of the distribution in a given population of synapses (Figure 2E).

Moreover, this data processing allows the kinetic responses obtained during the FM1-43 experiment to be sorted blindly into different groups according to the intensity of IR. Microsoft Excel can be used to generate logic value codes (0 and 1) to blindly sort the functional responses (step 6 in Figure 1). In the present study we sorted the responses into three groups: the whole population of responses; the responses of ROIs with IR intensity more than twice the mean value; and the responses of ROIs in which IR intensity was less than half the mean value. The mean values of the three groups can then be plotted. An example of an individual experiment with a positive kinetic segregation is shown in Figure 2F (see also Figure 3E and 3F). For multiple comparisons, we used ANOVA followed by a Bonferroni test to compare the means.

Results and discussion

The intensity of RIM1 α , unlike that of Munc13-1, is a *bona fide* indicator of synaptic efficiency

Although for decades primary neuronal cultures have been used to study various aspects of synaptic physiology, including pre- and postsynaptic function [6,13,22,32,33], synaptopathies and intersynaptic trafficking [34-37], the relationship between certain parameters of synaptic activity and protein content remains unclear. While it is widely accepted that different proteins carry out specific activities (e.g., exo- and endocytic proteins mediate exo- and endocytic processes, respectively), few studies have demonstrated a quantitative correlation between synaptic function and protein content. Several aspects of presynaptic function have recently been correlated with protein levels at a given release site [7], and interference with the dynamics of protein synthesis/degradation has been shown to modulate synaptic strength [4,6,38]. For example, RIM1 α levels are linearly related to the release probability (Pr) of local axon collaterals of CA3 [7], and presynaptic efficiency can be bidirectionally modulated by modifying RIM1 α levels [38]. To determine the extent to which differences in the magnitude of responses between individual nerve terminals are caused by variations in protein content, we developed a method in which *post-hoc* immunolabelling is combined with (but not limited to) optical tracking of the synaptic vesicle (SV) cycle with FM1-43, this is a powerful tool to study the correlation between protein content and synaptic function, in this case vesicular release, a relationship that has remained undefined for decades in studies of synaptic function. Using the extensive body of published data relating to the exocytotic steps of the SV cycle (for review see [39]), we investigated whether the levels of two key proteins involved in the formation of exocytic complexes (Munc13-1 and RIM1 α) are correlated with presynaptic activity, as measured by vesicular release.

Our results demonstrate that synaptic levels of RIM1 α are positively correlated with FM1-43 unloading, which is a direct measure of vesicular reuse and release (Figure 3E and 3F). In this context we have found that those synaptic boutons whose RIM levels are higher than 2 times the mean IR value yielded by the whole population of boutons, are more efficient in terms of FM1-43 release. The opposite effect was found in the subpopulation of boutons with RIM1 α levels lower than 0.5 times the mean IR value (Unloaded fraction; Whole population: $33.95 \pm 0.27\%$, $N = 4$, $n = 3666$; RIM1 α IR > 2: $36.41 \pm 0.53\%$, $N = 4$, $n = 502$, $**p < 0.01$; RIM1 α IR < 0.5: $30.18 \pm 0.47\%$, $N = 4$, $n = 1300$, $**p > 0.01$; ANOVA followed by Bonferroni's Test for means comparison). These results are consistent with previous findings [4,7,13,29] and they validate the use of this technique. Based on these findings, it is possible to classify the functional responses of the FM1-43 experiment blindly into categories of increasing efficiency by sorting the ROIs according to the intensity of RIM1 α IR. RIM1 α is a pivotal protein in the arrangement of presynaptic active zones [26] and it participates in a complex interaction network along with other presynaptic proteins, such as the vesicular protein Rab3 [40] and the priming factor Munc13-1 [8]. Another important role of RIM1 α is to tether calcium channels to presynaptic active zones via its PDZ domain [13,29,41], a function that may be critical in coupling exocytosis to calcium influx. RIM1 α also undergoes PKA-dependent phosphorylation [42] and ubiquitin-dependent degradation via the E3 ubiquitin-ligase SCRAPER [38]. Low levels of RIM are associated with low mEPSC frequencies and low calcium sensitivity [38], while high levels are linked with an increased Pr [7]. These data support the hypothesis that RIM levels can dictate the release properties of different synapses, serving as a source of variability among populations of synapses.

Another important protein involved in the formation of exocytic complexes is the mammalian homologue of UNC13, the multidomain Munc13-1 protein, although we were unable to detect a positive correlation between Munc13-1 levels and synaptic efficiency (Figure 4E and 4F, Unloaded fraction; Whole population: $33.51 \pm 0.20\%$, $N = 4$, $n = 4431$; Munc13-1 IR > 2: $33.37 \pm 0.47\%$, $N = 4$, $n = 701$, non significant; Munc13-1 IR < 0.5: $33.15 \pm 0.31\%$, $N = 4$, $n = 2269$, non significant). While unexpected, this result adds further weight to the positive correlation between RIM1 α levels and FM1-43 unloading, indicating that the differences observed were not due to image processing or analysis. However, mechanistic differences between these two proteins could account for the failure to identify a correlation between Munc13-1 levels and vesicular release. Munc13-1 exists as a homodimer that must heterodimerize with RIM1 α to carry out its priming function [14]. Moreover, it can also be regulated by diacylglycerol [16], calmodulin [43] and calcium [44].

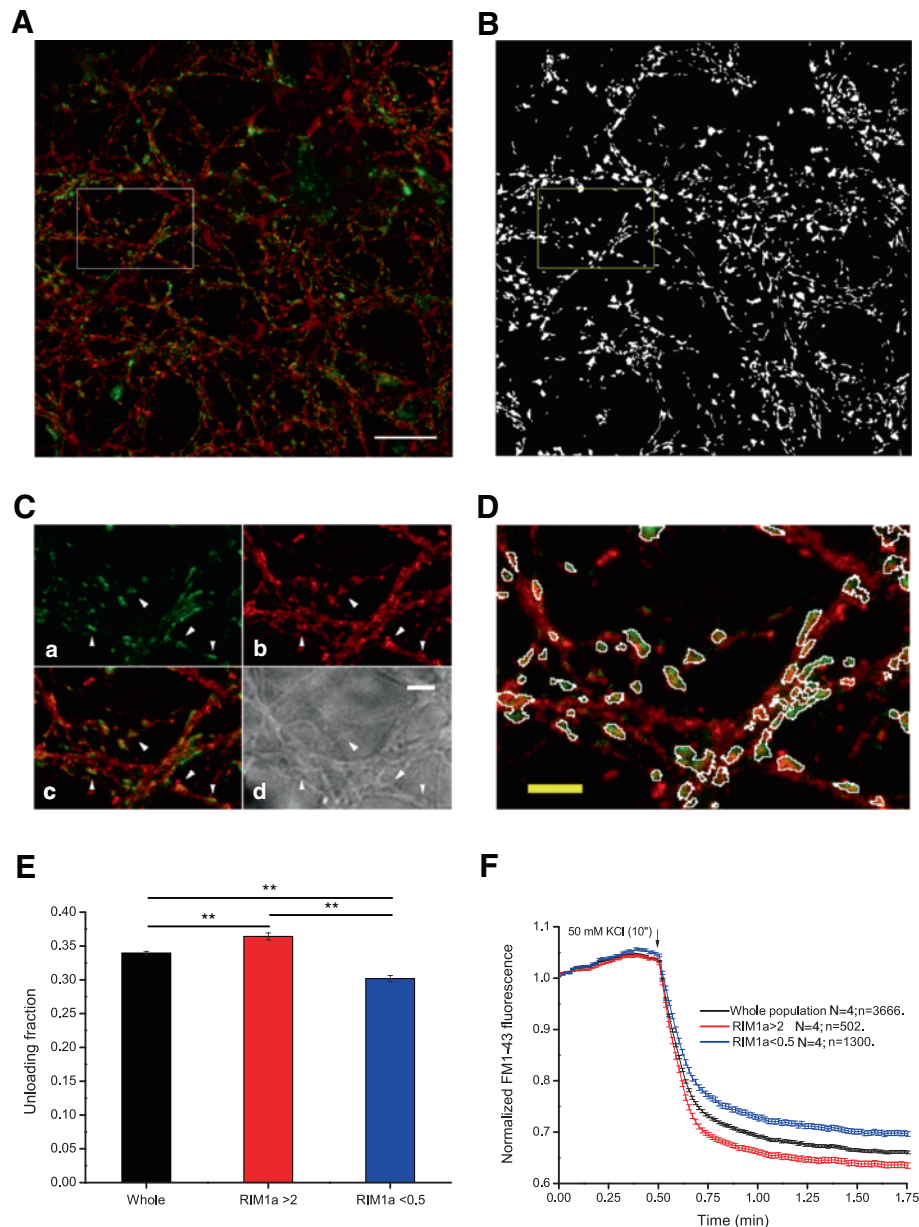


Figure 3 RIM1α levels correlate with synaptic efficiency. **A)** Post-hoc immunocytochemical images of FM1-43 loaded boutons in green and anti-RIM1α in red. **B)** Binary mask of the field imaged in **A)** obtained using IgorPro software for processing the experiments. **C)** Higher magnification detail of the boxed area in **A)** showing FM1-43 staining (a), RIM1α labelling (b), the merged image (c) and phase contrast image (d). Arrowheads indicate different synaptic boutons. Scale bar = 5 μm. **D)** Area boxed in A after superimposition of the detail boxed in B. Note the absence of “dead” pixels in the different ROIs in both channels (FM1-43 and RIM1α). **E)** Mean FM1-43 unloading values of the whole population of synaptic boutons (black), the subpopulation of synaptic boutons whose RIM1α content is higher than 2 (red) and the subpopulation of those ROIs which RIM1α content is lower than 0.5 (blue). **F)** Normalized FM1-43 unloading according to RIM1α IR values: whole population in black, subpopulation of synaptic boutons with IR > 2 in red and subpopulation of synaptic boutons with IR value lower than 0.5 in blue. Unloading fractions in **E)** and traces in **F)** are means of 3666 synaptic boutons from 4 covers (whole population), 502 boutons from 4 covers (>2) and 1300 boutons from 4 covers (<0.5). Scale bar = 25 μm. One way ANOVA followed by Bonferroni’s test for means comparison was performed. Significance was considered when $p < 0.05$.

Diacylglycerol binding to Munc13-1 translocates the protein to the membrane, where it can carry out its priming function [45]. Hence, activation of the priming function of Munc13-1 involves several regulatory steps. We propose

that the total levels of Munc13-1 (as determined by IR measurements) do not allow us to distinguish between active and inactive pools of this protein, which might explain the lack of a correlation between Munc13-1 IR and

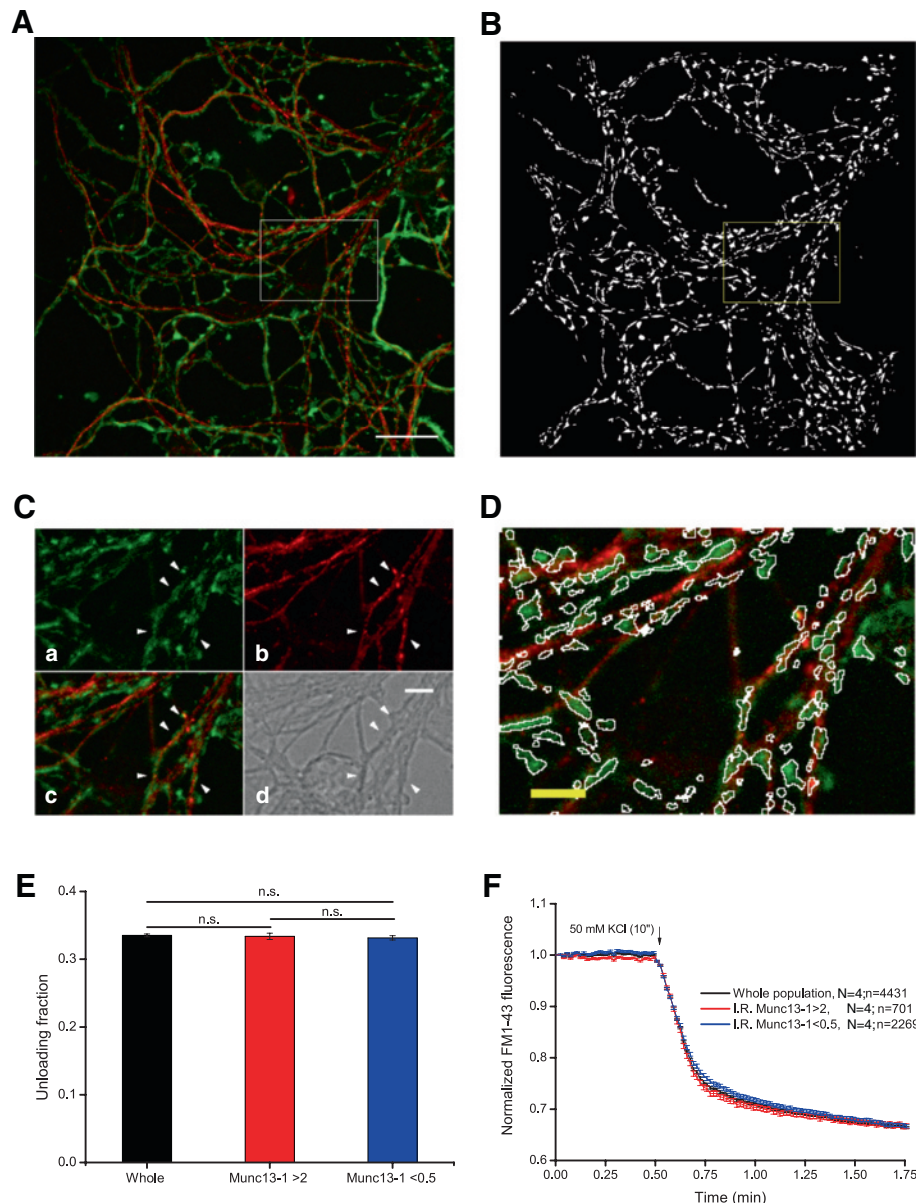


Figure 4 Munc13-1 levels do not correlate with synaptic efficiency. **A)** Post-hoc immunocytochemical images of FM1-43 loaded boutons in green and anti-Munc13-1 in red. **B)** binary mask of the field imaged in **A)** obtained using IgorPro software for processing the experiments. **C)** Higher magnification detail of the boxed area in **A)** showing FM1-43 staining (a), Munc13-1 labelling (b), the merged image (c) and phase contrast image (d). Arrowheads indicate different synaptic boutons. Scale bar = 5 μ m. **D)** Area boxed in **A)** after superimposition of the detail boxed in **B)**. Note the absence of "dead" pixels in the different ROIs in both channels (FM1-43 and Munc13-1). **E)** Unloading fraction values of the whole population of synaptic boutons (black), the subpopulation of synaptic boutons whose Munc13-1 content is higher than 2 (red) and the subpopulation of those ROIs which Munc13-1 content is lower than 0.5 (blue). **F)** Normalized FM1-43 unloading according to Munc13-1 IR values: whole population in black, subpopulation of synaptic boutons with IR > 2 in red and subpopulation of synaptic boutons with IR value lower than 0.5 in blue. Unloading fractions in **E)** and traces in **F)** are means of 4461 synaptic boutons from 4 covers (whole population), 761 boutons from 4 covers (>2) and 2261 boutons from 4 covers (<0.5). Scale bar = 25 μ m. One way ANOVA followed by Bonferroni's test for means comparison was performed. Significance was considered when $p < 0.05$.

vesicular release. Moreover, we cannot rule out the possibility that poor antibody sensitivity or specificity accounts for the absence of a correlation between global Munc13-1 levels and synaptic efficiency. However, both antibodies identified a single band of the expected molecular

weight when assessed in immunoblots (Additional file 2: Figure S2).

In the present study, we present a method that can be used to correlate a functional parameter of synaptic physiology (SV release) with the levels of different proteins

present at a given release site. The main advantage of this technique is the reduced user intervention during data processing, as manual selection and drawing of the different ROIs is avoided. In most studies assessing synaptic function using image techniques, ROIs are user-defined and as such, they represent a source of potential bias. This bias is not only due to the poor sensitivity of the human eye compared with processing software but also, because the ROI shape does not exactly match that of the synaptic boutons, resulting in the inclusion of dead pixels in the ROIs defined, which can in turn affect the numerical data obtained. Moreover, manual selection usually renders fewer ROIs, which is not optimal for high-level statistical tests. In our protocol we employed an automated routine [46] to generate a mask that includes several hundred ROIs per experiment, the shape of which exactly matches that of the FM1-43 puncta and the IR puncta in the *post-hoc* images. This routine also generates a set of images in which the background is subtracted automatically and that can be used for analysis. The validity of this method is corroborated by the correlation observed between RIM1 α levels and the effectiveness of vesicular release, consistent with previous data [4,7,38]. Moreover, the responses are blindly sorted according to their IR intensity, thereby eliminating another source of bias. This protocol is not limited to the assessment of synaptic activity using FM1-43, and it can be used to correlate semi-quantitative IR data with the calcium influx, measures of the exo/endocytic cycle with pHluorins, or electrophysiological recordings. This technique could also be further improved by incorporating super-resolution microscopy techniques such as STED [47,48] or STORM [49].

Conclusions

Altogether, our results indicate that nerve terminal content of RIM1 α strongly correlates with the release capacity of the nerve terminal measured with FM1-43, while no such a correlation was found with Munc13-1. This finding point out to RIM1 α as a crucial factor in determining synaptic efficiency and demonstrate the usefulness of this technique to analyse the molecular differences underlying the heterogeneous responses exhibited by neuronal networks.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Serial reconstruction of the imaged field. **A)** Synaptic boutons loaded with FM1-43 dye before (t_0) and after (t_{end}) stimulation with potassium chloride; contrast phase images of the same experiment field (white box) at different magnifications: 60 \times (**B**), 40 \times (**C**) and 20 \times (**D**). **E)** Serial reconstruction of 20 \times cell phase images of the field monitored during the experiment (white box) and surrounding areas. **F)** Contrast phase image at 20 \times magnification showing the field where the experiment was performed after fixing and labelling with the different antibody (matching field). Note the presence of distinctive hallmarks.

Additional file 2: Figure S2. Western blot of RIM1 α and Munc13-1 confirmed specificity of both antibodies. **A)** Western Blot of Munc13-1 (top green), β -Tubulin (bottom, red) and synaptophysin (bottom, green), showing a single band for Munc13-1 with the expected molecular weight. **B)** Western blot of RIM1 α (green, top) and β -Tubulin (green, bottom) showing that both antibodies recognize a single band with the expected molecular weight.

Additional file 3: Supplementary methods.

Additional file 4: Figure S3. FM1-43 experiment analysis routine using IgorPro software and ImageJ. **A)** Parameters used in IgorPro interface to automatically analyze the FM1-43 experiment. This software renders the mask and a set of background subtracted images. **B)** Import of the QualitySegment.iibw file in ImageJ software to draw a binary mask. The size of the image has to fit with the original images acquired during the experiment. **C)** Generation of the ROIset with ImageJ software by analyzing particles present in the mask. **D)** Import of the set of background-subtracted images for further analysis of the experiment with OriginPro.

Additional file 5: Figure S4. Alignment of FM1-43 with IR puncta after *post-hoc* ICC. **A)** Immunocytochemical images of FM1-43 in blue (pseudo colour), Alexa 488 (green) and Alexa 594 (red). Upper panels show ROIset superimposition and lower panels show line plot along a fiber. Note that the different ROIs are well fitted to the puncta in the different channels, this step is useful to visually check the alignment of the three channels. **B)** Arbitrary fluorescence units plot over the three channels of the ROIs indicated in **A**.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JRF, JSP and MT conceived the study. JRF, BA and DBM designed experiments, and were responsible for collect, analyse and interpret the data; JRF and JSP wrote the manuscript. MT and JSP acquired funding necessary for the completion of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank María del Carmen Zamora for her excellent technical assistance. This work was financed by grants from the Spanish MINECO (BFU2010-16947 to JS-P and BFU2012-32105 to MT), the 'Instituto de Salud Carlos III' RD06/0026 and the 'Comunidad de Madrid' (CAM-I2M2 2011-BMD-2349 to J S-P and MT). We thank Dr. M Sefton for editorial assistance.

Received: 16 April 2013 Accepted: 10 October 2013

Published: 18 October 2013

References

1. Bartolome-Martin D, Ramirez-Franco J, Castro E, Sanchez-Prieto J, Torres M: Efficient synaptic vesicle recycling after intense exocytosis concomitant with the accumulation of non-releasable endosomes at early developmental stages. *J Cell Sci* 2012, **125**(2):422-434.
2. Fejtova A, Davydova D, Bischof F, Lazarevic V, Altmann WD, Romorini S, Schone C, Zuschratter W, Kreutz MR, Garner CC, et al: Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of bassoon. *J Cell Biol* 2009, **185**(2):341-355.
3. Graf ER, Daniels RW, Burgess RW, Schwarz TL, DiAntonio A: Rab3 dynamically controls protein composition at active zones. *Neuron* 2009, **64**(5):663-677.
4. Lazarevic V, Schone C, Heine M, Gundelfinger ED, Fejtova A: Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing. *J Neurosci* 2011, **31**(28):10189-10200.
5. Turrigiano G: Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **4**(1):a005736-a005736.
6. Crawford DC, Chang CY, Hyrc KL, Mennerick S: Calcium-independent inhibitory G-protein signaling induces persistent presynaptic muting of hippocampal synapses. *J Neurosci* 2011, **31**(3):979-991.

7. Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z: **Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone.** *Nat Neurosci* 2012, **15**(7):988–997.
8. Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J: **A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?** *EMBO J* 2005, **24**(16):2839–2850.
9. Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML: **A post-docking role for active zone protein Rim.** *Nat Neurosci* 2001, **4**(10):997–1005.
10. Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Südhof TC, Malenka RC: **RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation.** *Nature* 2002, **415**(6869):327–330.
11. Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Südhof TC: **RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone.** *Nature* 2002, **415**(6869):321–326.
12. Calakos N, Schoch S, Südhof TC, Malenka RC: **Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release.** *Neuron* 2004, **42**(6):889–896.
13. Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC: **RIM proteins tether Ca2+ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction.** *Cell* 2011, **144**(2):282–295.
14. Deng L, Kaeser PS, Xu W, Südhof TC: **RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13.** *Neuron* 2011, **69**(2):317–331.
15. Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N: **Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles.** *Nature* 1999, **400**(6743):457–461.
16. Rhee JS, Betz A, Pyott S, Reim K, Varoqueaux F, Augustin I, Hesse D, Südhof TC, Takahashi M, Rosenmund C, et al: **Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs.** *Cell* 2002, **108**(1):121–133.
17. Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee JS: **Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms.** *Neuron* 2002, **33**(3):411–424.
18. Wierenga CJ, Becker N, Bonhoeffer T: **GABAergic synapses are formed without the involvement of dendritic protrusions.** *Nat Neurosci* 2008, **11**(9):1044–1052.
19. Dobie FA, Craig AM: **Inhibitory synapse dynamics: coordinated presynaptic and postsynaptic mobility and the major contribution of recycled vesicles to New synapse formation.** *J Neurosci* 2011, **31**(29):10481–10493.
20. Langer D, Helmchen F: **Post hoc immunostaining of GABAergic neuronal subtypes following in vivo two-photon calcium imaging in mouse neocortex.** *Pflügers Arch* 2012, **463**(2):339–354.
21. Jurado S, Rodriguez-Pascual F, Sanchez-Prieto J, Reimunde FM, Lamas S, Torres M: **NMDA induces post-transcriptional regulation of alpha2-guanylyl-cyclase-subunit expression in cerebellar granule cells.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 8):1622–1631.
22. Clayton EL, Sue N, Smillie KJ, O'Leary T, Bache N, Cheung G, Cole AR, Wyllie DJ, Sutherland C, Robinson PJ, et al: **Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles.** *Nat Neurosci* 2010, **13**(7):845–851.
23. Kramer D, Minichiello L: **Cell culture of primary cerebellar granule cells.** *Methods Mol Biol* 2010, **633**:233–239.
24. Cheung G, Cousin MA: **Quantitative analysis of synaptic vesicle pool replenishment in cultured cerebellar granule neurons using FM dyes.** *J Vis Exp* 2011, **57**:e3143.
25. Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Südhof TC, Rettig J, Brose N: **Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release.** *Neuron* 1998, **21**(1):123–136.
26. Mittelstaedt T, Alvarez-Baron E, Schoch S: **RIM proteins and their role in synapse function.** *Biol Chem* 2010, **391**(6):599–606.
27. Flores-Otero J, Xue HZ, Davis RL: **Reciprocal regulation of presynaptic and postsynaptic proteins in bipolar spiral ganglion neurons by neurotrophins.** *J Neurosci* 2007, **27**(51):14023–14034.
28. Incontro S, Ramírez-Franco J, Sanchez-Prieto J, Torres M: **Membrane depolarization regulates AMPA receptor subunit expression in cerebellar granule cells in culture.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1813**(1):14–26.
29. Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A: **RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the drosophila neuromuscular junction.** *J Neurosci* 2012, **32**(47):16586–16596.
30. Butko MT, Savas JN, Friedman B, Delahunty C, Ebner F, Yates JR, Tsien RY: **PNAS plus: in vivo quantitative proteomics of somatosensory cortical synapses shows which protein levels are modulated by sensory deprivation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:E726–E735.
31. Sternberg SR: **Biomedical image-processing.** *Computer* 1983, **16**(1):22–34.
32. Garcia-Junco-Clemente P, Cantero G, Gomez-Sanchez L, Linares-Clemente P, Martinez-Lopez JA, Lujan R, Fernandez-Chacon R: **Cysteine string protein-alpha prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses.** *J Neurosci* 2010, **30**(21):7377–7391.
33. Kim SH, Ryan TA: **CDK5 Serves as a major control point in neurotransmitter release.** *Neuron* 2010, **67**(5):797–809.
34. Darcy KJ, Staras K, Collinson LM, Goda Y: **An ultrastructural readout of fluorescence recovery after photobleaching using correlative light and electron microscopy.** *Nat Protoc* 2006, **1**(2):988–994.
35. Staras K, Branco T, Burden JJ, Pozo K, Darcy K, Marra V, Ratnayaka A, Goda Y: **A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons.** *Neuron* 2010, **66**(1):37–44.
36. Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I, Bersot T, Steffens H, Schwartzmann R, Nagerl UV, El Mestikawy S, et al: **In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1Venus knock-in mice.** *J Neurosci* 2011, **31**(43):15544–15559.
37. Scott D, Roy S: **Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis.** *J Neurosci* 2012, **32**(30):10129–10135.
38. Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, et al: **SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release.** *Cell* 2007, **130**(5):943–957.
39. Südhof TC: **The presynaptic active zone.** *Neuron* 2012, **75**(1):11–25.
40. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC: **Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion.** *Nature* 1997, **388**(6642):593–598.
41. Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R: **RIM determines Ca2+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone.** *Neuron* 2011, **69**(2):304–316.
42. Lonart G, Schoch S, Kaeser PS, Larkin CJ, Südhof TC, Linden DJ: **Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses.** *Cell* 2003, **115**(1):49–60.
43. Junge HJ, Rhee JS, Jahn O, Varoqueaux F, Spiess J, Waxham MN, Rosenmund C, Brose N: **Calmodulin and Munc13 form a Ca2+ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity.** *Cell* 2004, **118**(3):389–401.
44. Shin OH, Lu J, Rhee JS, Tomchick DR, Pang ZP, Wojcik SM, Camacho-Perez M, Brose N, Machius M, Rizo J, et al: **Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca2+ regulator of synaptic exocytosis.** *Nat Struct Mol Biol* 2010, **17**(3):280–288.
45. Brose N, Rosenmund C: **Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 23):4399–4411.
46. Bergsman JB, Krueger SR, Fitzsimonds RM: **Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta.** *J Neurosci Methods* 2006, **152**(1-2):32–39.
47. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW: **Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(15):8206–8210.
48. Willig KI, Harke B, Medda R, Hell SW: **STED microscopy with continuous wave beams.** *Nat Methods* 2007, **4**(11):915–918.
49. Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang X: **Superresolution imaging of chemical synapses in the brain.** *Neuron* 2010, **68**(5):843–856.

doi:10.1186/1471-2202-14-127

Cite this article as: Ramírez-Franco et al.: Studying synaptic efficiency by post-hoc immunolabelling. *BMC Neuroscience* 2013 **14**:127.

Anexos II y III

Se muestran en detalle los análisis de inmunocitoquímica *post-hoc* para 8 proteínas sinápticas. Se muestran ejemplos de terminales individuales con distinto grado de descarga en experimentos de FM1-43 y distinto grado de inmunorreactividad para las distintas proteínas.

Anexo II

Se muestra, para cada proteína:

En los paneles superiores:

En verde, el marcaje de FM1-43; En rojo, el marcaje contra la proteína de interés; La superposición de los dos canales.

En los paneles inferiores:

Detalle de botones sinápticos mostrando la superposición de los dos canales en botones sinápticos individuales; Distribución de probabilidad acumulada mostrando la segregación de inmunorreactividades en función de la tasa de descarga de FM1-43; Ejemplos cinéticos de terminales individuales cuya inmunorreactividad se recoge como gráfico tridimensional en los paneles adyacentes.

Proteínas estudiadas:

A-Sinapsina

B- Fosfo-sinapsina

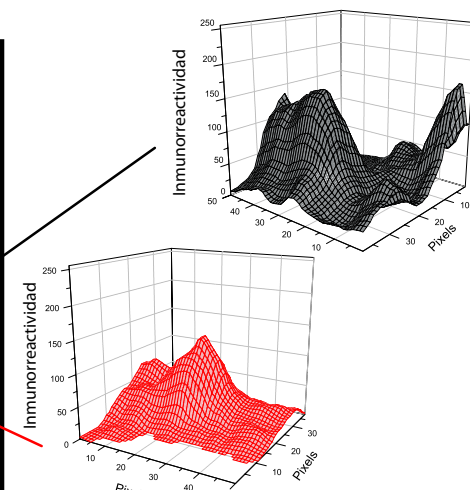
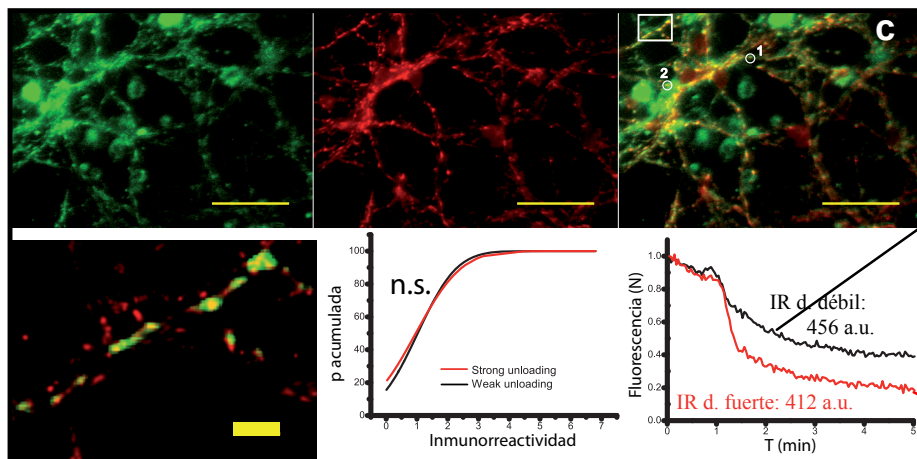
C- Calcineurina

D-GluA3

Anexo II

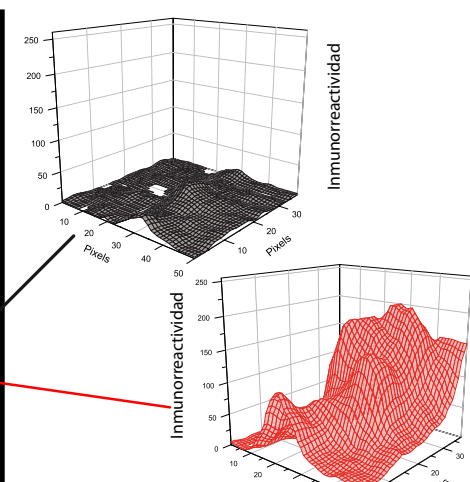
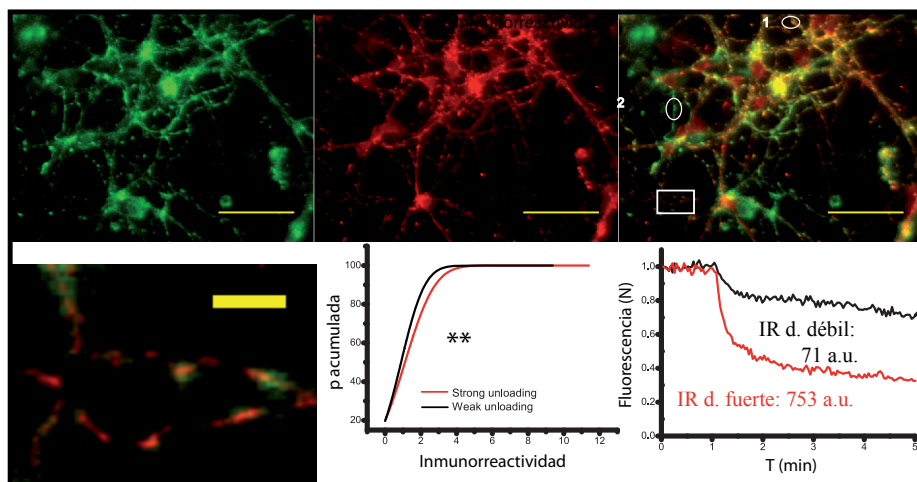
A

FM1-43(Verde)
Sinapsina(Rojo)



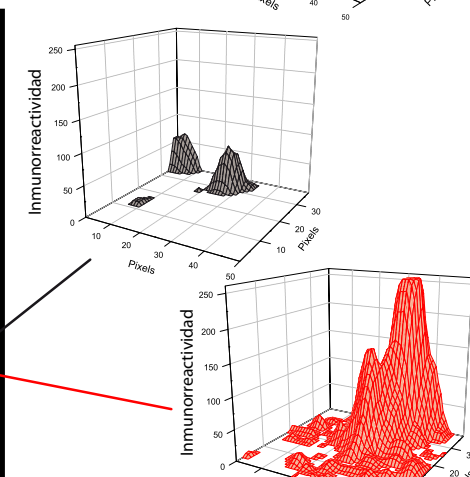
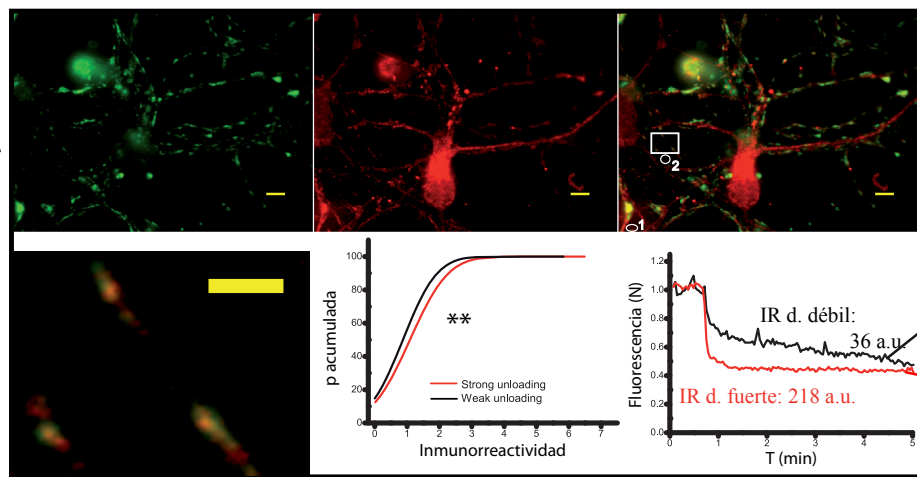
B

FM1-43(Verde)
Fosfo-Sinapsina(Rojo)



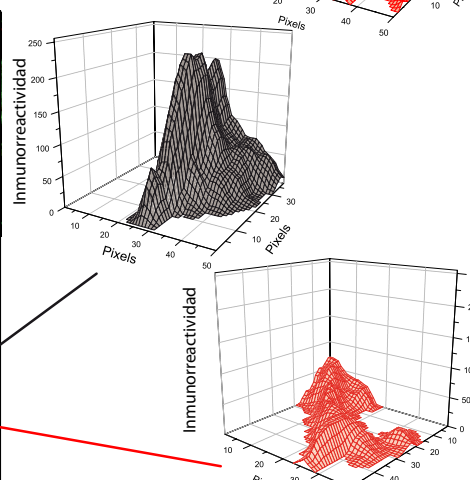
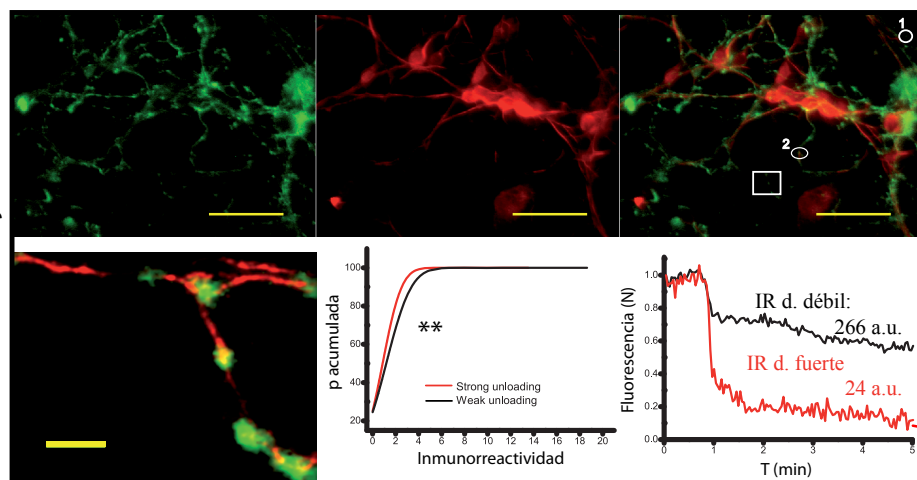
C

FM1-43(Verde)
Calcineurina (Rojo)



D

FM1-43(Verde)
GluA3 (Rojo)



Anexo III

Se muestra, para cada proteína:

En los paneles superiores:

En verde, el marcaje de FM1-43; En rojo, el marcaje contra la proteína de interés; La superposición de los dos canales.

En los paneles inferiores:

Detalle de botones sinápticos mostrando la superposición de los dos canales en botones sinápticos individuales; Distribución de probabilidad acumulada mostrando la segregación de inmunorreactividades en función de la tasa de descarga de FM1-43; Ejemplos cinéticos de terminales individuales cuya inmunorreactividad se recoge como gráfico tridimensional en los paneles adyacentes.

Proteínas estudiadas:

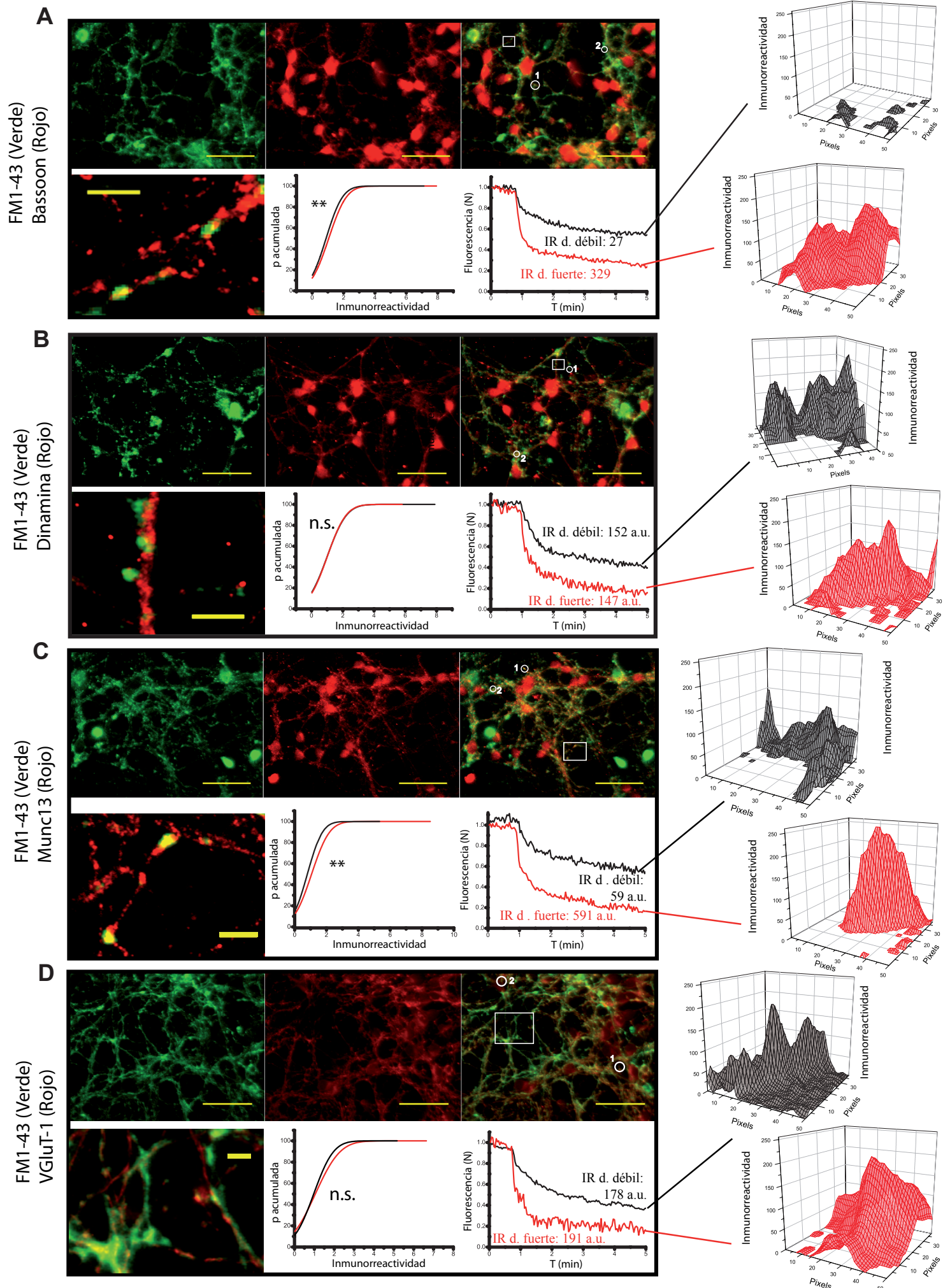
A-Bassoon

B-Dinamina

C-Munc13-1

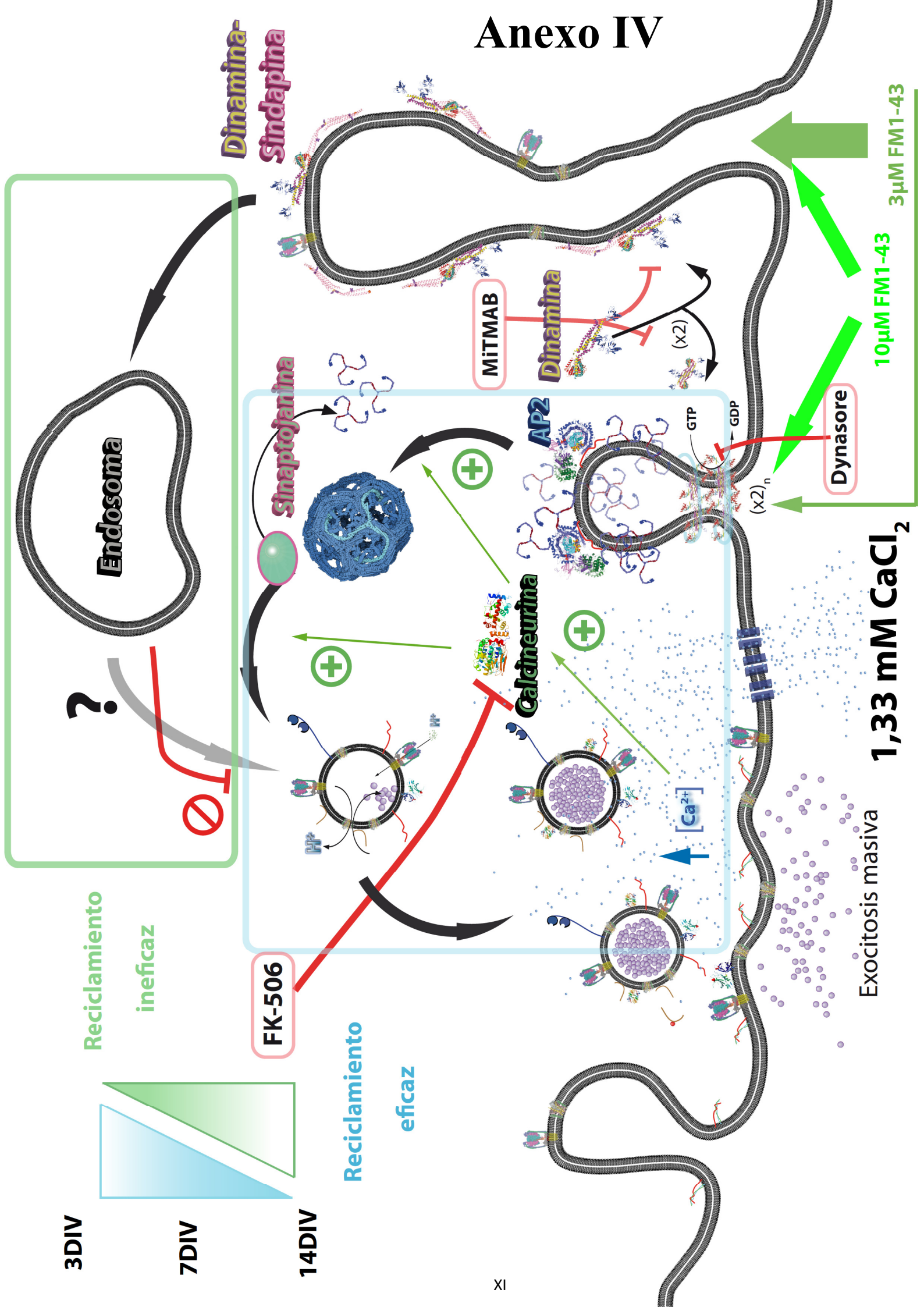
D-VGluT1

Anexo III



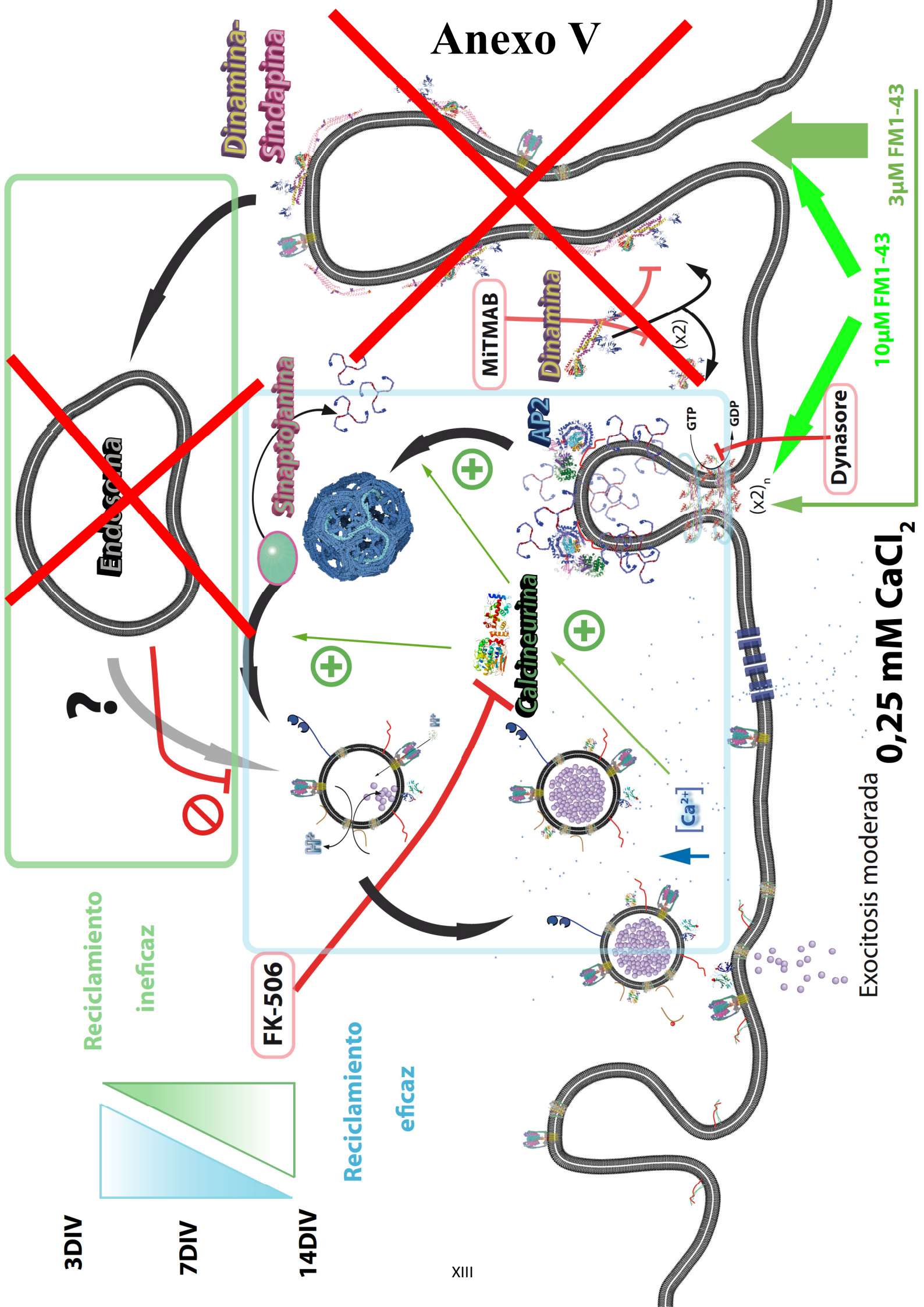
Anexo IV

Se muestra un resumen gráfico de las vías de endocitosis puestas en marcha ante estimulaciones de alta intensidad en los distintos estadios de maduración del cultivo. Se ilustran las principales proteínas implicadas en cada una de las rutas de endocitosis, así como el efecto de los distintos fármacos empleados para el estudio de estos mecanismos. Obsérvese la coexistencia de mecanismos eficaces e ineficaces de reciclamiento a 7DIV y ante estimulaciones de alta intensidad.



Anexo V

Se muestra un resumen gráfico de las vías de endocitosis puestas en marcha ante estimulaciones de baja intensidad en los distintos estadios de maduración del cultivo. Se ilustran las principales proteínas implicadas en cada una de las rutas de endocitosis, así como el efecto de los distintos fármacos empleados para el estudio de estos mecanismos. Obsérvese la inexistencia de mecanismos de reciclamiento ineficaz al estimular a bajas concentraciones de CaCl_2 y en estadios maduros del cultivo.



Anexo VI

Esquema de la inhibición mediada por la activación del receptor CB1 con HU-210. Se muestra la inhibición de los canales de calcio, la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de los canales de potasio. La inactivación de EPAC podría conducir a un defecto en la preparación de las vesículas.

1-Acercamiento y preparación de las vesículas sinápticas.

2-Fusión calcio dependiente de las vesículas sinápticas.

Anexo VI

